



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Übersetzung der
europäischen Patentschrift

87 EP 0 476 014 B1

10 DE 690 12 119 T 2

51 Int. Cl.⁵:
C 07 K 1/04
C 07 K 17/08
C 07 K 17/14
B 01 J 19/00

DE 690 12 119 T 2

21	Deutsches Aktenzeichen:	690 12 119.9
88	PCT-Aktenzeichen:	PCT/NL90/00081
88	Europäisches Aktenzeichen:	90 909 187.8
87	PCT-Veröffentlichungs-Nr.:	WO 90/15070
85	PCT-Anmeldetag:	7. 8. 90
87	Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung:	13. 12. 90
87	Erstveröffentlichung durch das EPA:	25. 3. 92
87	Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	31. 8. 94
47	Veröffentlichungstag im Patentblatt:	22. 12. 94

30 Unionspriorität: 32 33 31

07.06.89 US 382901

07.03.90 US 492462

73 Patentinhaber:

Affymax Technologies N.V., Curacao, Niederl.
Antillen, NL

74 Vertreter:

Tauchner, P., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Heunemann,
D., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Rauh, P., Dipl.-Chem.
Dr.rer.nat.; Hermann, G., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.;
Schmidt, J., Dipl.-Ing.; Jaenichen, H., Dipl.-Biol.
Dr.rer.nat.; von Uexküll-Güldenband-Menzel, A.,
Dr.phil. (Ph.D.); Weinberger, R., Dipl.-Chem.Univ.
Dr.rer.nat.; Bubiak, W., Dipl.-Chem. Univ.,
Pat.-Anwälte; Tremmel, H., Rechtsanw., 81875
München

84 Benannte Vertragsstaaten:...

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

72 Erfinder:

PIRRUNG, Michael, C., Durham, NC 27707, US;
READ, J., Leighton, Palo Alto, CA 94301, US;
FODOR, Stephen, P., A., Palo Alto, CA 94303, US;
STRYER, Lubert, Stanford, CA 94305, US

84 SYNTHESE VON IMMOBILISIERTEN POLYMEREN IN GROSSEM MASSSTAB.

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 89 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 690 12 119 T 2

Best Available Copy

10. Aug. 1994

EP-B-0 476 014
(90 90 9187.8)
Affymax Technologies
u. Z.: EP-2898

Synthese von immobilisierten Polymeren in großem Maßstab

Hinweis auf das Copyright

Ein Teil der Beschreibung dieses Patentdokumentes enthält Material, das durch Copyright geschützt ist. Der Inhaber des Copyrights erhebt keine Einwände gegen eine Vervielfältigung des Patentdokumentes oder der Patentbeschreibung, wenn die Kopie in einer Patentakte oder in Registern des Patentamtes erscheint, behält sich ansonsten allerdings alle Rechte des Copyright vor.

Hintergrund der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Synthese und Anordnung von Materialien in bestimmten Bereichen. Die Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren und eine dafür bestimmte Vorrichtung zur Herstellung unterschiedlicher chemischer Sequenzen in bestimmten Bereichen auf der Oberfläche eines einzigen Substrats. Die Erfindung kann beispielsweise verwendet werden, um ein Oligomer, Peptid, eine Nucleinsäure, ein Oligosaccharid, Phospholipid, Polymer oder kongenes Arzneimittelpräparat herzustellen, insbesondere um Quellen einer chemischen Vielfalt bereitzustellen, die für ein Screening auf eine biologische Aktivität verwendet werden können.

Der Zusammenhang zwischen Struktur und Aktivität von Molekülen ist ein wesentlicher Gegenstand der Untersuchung von biologischen Systemen. Die Zusammenhänge von Struktur und Aktivität sind wesentlich, um beispielsweise die Funktion von Enzymen, die Art der Kommunikation von Zellen untereinander, sowie die zellulären Kontroll- und "Feedback"-systeme zu verstehen.

Von bestimmten Makromolekülen weiß man, daß sie mit anderen Molekülen, die eine sehr spezifische, dreidimensionale, räumliche Struktur und Elektronenanordnung aufweisen, in Wechselwirkung treten. Jedes große, eine derartige Spezifität aufweisende Molekül kann ein Rezeptor sein, ungeachtet dessen, ob es ein Enzym, das die Hydrolyse eines metabolischen Zwischenprodukts katalysiert, ein Zelloberflächenprotein, das den Membrantransport von Ionen vermittelt, ein Glykoprotein mit der Funktion, eine bestimmte Zelle gegenüber den Nachbarzellen zu identifizieren, ein im Plasma zirkulierender Antikörper der IgG-Klasse, eine Oligonucleotidsequenz der Kern-DNA oder ähnliches ist. Die verschiedenen Moleküle, die die Rezeptoren selektiv binden, bezeichnet man als Liganden.

Es sind viele Tests zur Messung der Bindungsaffinität von bekannten Rezeptoren und Liganden verfügbar, die Aussagefähigkeit derartiger Experimente ist jedoch häufig durch Zahl und Art der verfügbaren Liganden beschränkt. Neue Liganden werden gelegentlich zufällig oder durch Anwendung neuer Verfahren zur Aufklärung der Molekülstruktur, die eine Röntgenkristallstrukturanalyse und genetische Rekombinationsverfahren für Proteine einschließen, gefunden.

Kleine Peptide sind ein Beispiel für ein System zur Erforschung des biologischen Zusammenhangs zwischen Struktur und Funktion. Ein Peptid ist eine Sequenz von Aminosäuren. Wenn die zwanzig natürlich vorkommenden Aminosäuren zu polymeren Molekülen kondensiert werden, bilden sie eine Vielzahl von dreidimensionalen Konfigurationen, die jeweils aufgrund einer bestimmten Aminosäuresequenz und der Wirkung eines Lösungsmittels erhalten werden. Als Pentapeptide der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren können beispielsweise 20^5 oder 3,2 Millionen unterschiedliche Peptide erhalten werden. Die Wahrscheinlichkeit, daß Moleküle dieser Größe in Rezeptorbindungsuntersuchungen nützlich sind, wird durch analytische Untersuchungen der Epitope unterstützt, die zeigen, daß einige Antikörper mit großer Spezifität Sequenzen von wenigen Aminosäuren erkennen. Ferner weisen

kleine Peptide aufgrund des durchschnittlichen Molekulargewichts von Aminosäuren eine Größe auf, die für viele gegenwärtig nützliche Arzneimittel verwendet werden kann.

Die Entwicklung von Arzneimitteln ist eine auf einer derartigen Untersuchung der Zusammenhänge von Struktur und Aktivität beruhende Forschungsrichtung. Häufig kann die gegenwärtige pharmazeutische Forschung als das Verfahren zur Suche nach neuen Liganden mit gewünschten Spezifitätsmustern für biologisch wichtige Rezeptoren beschrieben werden. Ein weiteres Beispiel ist die Forschung, in der nach neuen Verbindungen gesucht wird, die in der Landwirtschaft, beispielsweise als Pestizide und Herbizide, verwendet werden können.

Gelegentlich kann ein rationales Verfahren zur Entwicklung von Liganden nur schwer gefunden werden und ist wenig ergiebig. Bisherige Verfahren zur Herstellung von großen Mengen verschiedener Polymere waren extrem langsam, sofern sie in einem Maßstab verwendet wurden, der ein wirksames spezifisches oder nicht-spezifisches Screening zuließ. Das Merrifield-Verfahren (J. Am. Chem. Soc. 85 (1963), 2149-2154, das hier durch Bezugnahme für alle Zwecke eingeschlossen ist) ist beispielsweise zur Synthese von Peptiden auf einem festen Träger verwendet worden. Im Merrifield-Verfahren wird eine Aminosäure kovalent an einen Träger aus unlöslichem Polymer gebunden. Eine andere Aminosäure mit einer alpha-Schutzgruppe wird mit der kovalent gebundenen Aminosäure unter Bildung eines Dipeptids umgesetzt. Nach dem Waschen wird die Schutzgruppe entfernt und dem Dipeptid eine dritte Aminosäure mit einer alpha-Schutzgruppe zugesetzt. Das Verfahren wird bis zum Erhalt eines Peptids mit der gewünschten Länge und Sequenz fortgesetzt. Wenn das Merrifield-Verfahren verwendet wird, kann unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten nicht mehr als eine Handvoll von Peptidsequenzen an einem Tag synthetisiert werden.

Zur Synthese einer großen Zahl von Polymersequenzen ist ferner die Verwendung von mehreren Reaktionsgefäßen zur Polymersynthese vorgeschlagen worden. Ein röhrenförmiges

Reaktionssystem kann beispielsweise zur Synthese eines linearen Polymers auf einem Festphasenträger verwendet werden, indem automatisch sequentiell Reagenzien zugesetzt werden. Durch dieses Verfahren kann ebenfalls noch keine ausreichend große Zahl von Polymersequenzen für ein wirksames wirtschaftliches Screening synthetisiert werden.

Es sind auch Verfahren zur Herstellung einer Vielzahl von Polymersequenzen bekannt, in denen ein gelöcherter Behälter eine bekannte Menge von reaktiven Partikeln einschließt, wobei die Partikel größer als die Löcher des Behälters sind. Die Behälter können mit den gewünschten Materialien selektiv umgesetzt werden, um die gewünschten Sequenzen der Produktmoleküle zu synthetisieren. Wie andere im Stand der Technik bekannte Verfahren kann dieses Verfahren nicht praktisch verwendet werden, um eine genügende Zahl von Polypeptiden für ein wirksames Screening zu synthetisieren.

Andere Verfahren sind ebenfalls beschrieben worden. Diese Verfahren schließen die Synthese von Peptiden an 96 Plastiknadeln ein, die in das Format von Standard-Mikrotiterplatten passen. Obwohl diese Verfahren ziemlich nützlich waren, bleiben unglücklicherweise wesentliche Probleme erhalten. Diese Verfahren sind beispielsweise in der Vielfalt von Sequenzen, die wirtschaftlich synthetisiert und einem Screening unterzogen werden können, weiter beschränkt.

Es gibt außerdem Verfahren zur Immobilisierung von zuvor synthetisierten Liganden oder Rezeptoren auf Oberflächen. US-Patent Nr. 4,562,157 von Lowe offenbart ein Verfahren, in dem ein Substrat zunächst behandelt wird, um durch Licht aktivierbare Vernetzungsgruppen auf einer Oberfläche anzuordnen. Die Oberfläche wird anschließend durch eine Maske in Gegenwart eines Ligands oder Rezeptors bestrahlt. Nach der Bestrahlung werden die Vernetzungsgruppen aktiviert und bilden mit dem Ligand oder Rezeptor auf der Oberfläche kovalente Bindungen aus. Wenn jedoch ein Ligand oder Rezeptor einmal an einer bestimmten Stelle mit der Oberfläche vernetzt ist, kann die Stelle in

anschließenden Bestrahlungsschritten nicht aktiviert werden.

Dem vorstehenden kann entnommen werden, daß ein verbessertes Verfahren und eine verbesserte Vorrichtung zur Synthese einer Vielzahl von chemischen Sequenzen an bestimmten Stellen erwünscht ist.

Zusammenfassung der Erfindung

In einem Gesichtspunkt stellt die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines Satzes von Polymeren durch Monomer-Monomer-Synthese auf vorbestimmten Bereichen eines Substrats bereit, wobei die nachstehend beschriebenen Schritte eingeschlossen sind:

Bestrahlung eines ersten vorbestimmten Bereiches auf einer Oberfläche des Substrats, wobei die Oberfläche funktionelle Gruppen aufweist, die mit durch Bestrahlung entfernbaren Schutzgruppen geschützt sind, um die Schutzgruppen davon zu entfernen,

Inkontaktbringen der Oberfläche mit einem ersten Monomer, um das Monomer an die von Schutzgruppen befreiten funktionellen Gruppen in den ersten vorbestimmten Bereichen zu kuppeln, wobei das Monomer eine funktionelle Gruppe aufweist, die mit einer durch Bestrahlung entfernbaren Schutzgruppe geschützt ist,

Bestrahlung eines zweiten vorbestimmten Bereiches (der der gleiche wie der erste vorbestimmte Bereich sein kann oder nicht) der Oberfläche zur Entfernung der Schutzgruppen davon,

Inkontaktbringen der Oberfläche mit einem zweiten Monomer (das das gleiche wie das erste Monomer sein kann oder nicht), um das Monomer an die von den Schutzgruppen befreiten funktionellen Gruppen in dem zweiten vorbestimmten Bereich zu kuppeln, wobei das Monomer eine funktionelle Gruppe aufweist, die mit einer durch Bestrahlung entfernbaren Schutzgruppe geschützt ist,

wobei das Verfahren ferner die Durchführung zusätz-

licher Schritte der Bestrahlung und des Inkontaktbringens mit einem Monomer und zusätzlicher Kupplungsschritte umfaßt, die zur Bildung des Satzes notwendig sind, wobei mindestens ein Teil von mindestens einem der ersten und zweiten vorbestimmten Bereiche in mindestens einem dieser zusätzlichen Schritte des Inkontaktbringens und der Kupplung bestrahlt wird und wobei die Polymere Stellen auf der Oberfläche und Sequenzen aufweisen, die durch die Bestrahlungsmuster während der Bestrahlungsschritte verursacht werden, und durch die besonderen Monomere, die in den Kontakt- und Kupplungsschritten gekuppelt werden, und mit der Maßgabe, daß das letzte Monomer in jeder Sequenz nicht mit einer durch Bestrahlung entfernbaren Schutzgruppe geschützt sein muß.

Ein weiterer erfindungsgemäßer Gesichtspunkt betrifft die Verwendung einer Vorrichtung, wobei die Vorrichtung für die Durchführung eines Verfahrens gemäß Anspruch 1 geeignet ist und umfaßt:

(a) ein Substrat mit einer Oberfläche, die funktionelle Gruppen aufweist, die durch Schutzgruppen geschützt sind, welche durch Bestrahlung entferntbar sind, wobei die Oberfläche an der Stelle, wo die Schutzgruppen entfernt wurden, aktiviert ist,

(b) Mittel zur selektiven Bestrahlung vorbestimmter Bereiche auf der Oberfläche, und

(c) eine Strahlungsquelle zur Bestrahlung der Oberfläche, wobei die Vorrichtung zur Bestrahlung der vorbestimmten Bereiche in einer vorbestimmten Reihenfolge und für jeden vorbestimmten Bereich eine vorbestimmte Anzahl von Wiederholungen verwendet wird, so daß eine Vielzahl von Polymeren hergestellt wird, die aus mindestens zwei Monomeren bestehen und Stellen auf der Oberfläche aufweisen, die durch die Bestrahlungsmuster definiert sind, die während der Bestrahlung verursacht werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform weist ein Substrat Linkermoleküle auf. Ein Terminus der Linkermoleküle weist eine reaktive funktionelle Gruppe auf, die mit einer

durch Bestrahlung entfernbaren Schutzgruppe geschützt ist. Unter Verwendung von lithographischen Verfahren wird die durch Bestrahlung entfernbare Schutzgruppe belichtet und in den zuerst ausgewählten Bereichen von den Linkermolekülen entfernt. Das Substrat wird anschließend gewaschen oder auf andere Weise mit einem ersten Monomer in Kontakt gebracht, das mit den exponierten funktionellen Gruppen auf den Linkermolekülen reagiert. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Monomer eine Aminosäure, die eine durch Bestrahlung entfernbare Schutzgruppe an ihrem Amino- oder Carboxyterminus enthält, und das Linkermolekül endet an einer Amino- oder Carboxylgruppe, die eine durch Bestrahlung entfernbare Schutzgruppe trägt.

Anschließend wird ein zweiter Satz von ausgewählten Bereichen belichtet und die durch Bestrahlung entfernbare Schutzgruppe des Linkermoleküls/der geschützten Aminosäure am zweiten Satz von Bereichen entfernt. Das Substrat wird anschließend zur Umsetzung mit den exponierten funktionellen Gruppen mit einem zweiten Monomer in Kontakt gebracht, das eine durch Bestrahlung entfernbare Schutzgruppe enthält. Dieses Verfahren wird wiederholt, um selektiv Monomere anzuknüpfen, bis Polymere einer gewünschten Länge und einer gewünschten chemischen Sequenz erhalten werden. Durch Bestrahlung entfernbare Gruppen werden gegebenenfalls anschließend entfernt und die Sequenz danach gegebenenfalls abgespalten. Gegebenenfalls vorhandene Schutzgruppen von Seitenketten werden ebenfalls entfernt.

Unter Verwendung der hier beschriebenen lithographischen Verfahren kann Licht auf relativ kleine und ganz bestimmte Bereiche auf dem Substrat gerichtet werden. Es können daher Polymere von bekannter chemischer Sequenz an bestimmten Stellen auf dem Substrat synthetisiert werden.

Das erhaltene Substrat weist zahlreiche Verwendungsmöglichkeiten auf, wobei beispielsweise das Screening einer Vielzahl von Polymeren auf eine biologische Aktivität eingeschlossen ist. Zur Durchführung des Screening auf eine biologische Aktivität wird das Substrat einem oder mehreren

Rezeptoren ausgesetzt, beispielsweise Antikörper ganzen Zellen, Rezeptoren auf Vesikeln, Lipiden oder irgendeinem anderen der zahlreichen Rezeptoren. Die Rezeptoren werden vorzugsweise beispielsweise mit einem Fluoreszenzmarker, radioaktiven Marker oder einem mit dem Rezeptor reagierenden markierten Antikörper markiert. Die Stelle des Markers auf dem Substrat wird beispielsweise mit einem Nachweiserfahren für Photonen oder einer Autoradiographie nachgewiesen. Durch Kenntnis der Sequenz des Materials an der Stelle, an der die Bindung nachgewiesen wird, kann sehr schnell entschieden werden, welche Sequenz an den Rezeptor bindet, und daher kann das Verfahren für das Screening einer Vielzahl von Peptiden verwendet werden. Weitere mögliche hier beschriebene erfindungsgemäße Anwendungen schließen Diagnostika ein, in denen verschiedene Liganden für bestimmte Rezeptoren auf einem Substrat angebracht und beispielsweise Blutseren auf Immunschwächen abgesucht werden. Weitere Beispiele für Anwendungen sind das selektive "Dotieren" von organischen Materialien in Halbleitervorrichtungen, etc..

Ein verbessertes Reaktionssystem zur Synthese von Polymeren wird ebenfalls beschrieben. Das Reaktionssystem schließt eine Substrathalterung ein, die ein Substrat an dessen Peripherie hält. Die Substrathalterung weist zwischen dem Substrat und der Halterung einen Reaktionsraum auf, durch den oder in den Reaktionsflüssigkeiten gepumpt werden oder fließen. Eine Maske wird auf dem Substrat angebracht oder darauf fokussiert und belichtet, um die Schutzgruppen der gewählten Bereiche auf dem Substrat im Reaktionsraum zu entfernen. Ein Monomer wird durch den Reaktionsraum gepumpt oder auf andere Weise mit dem Substrat in Kontakt gebracht und reagiert mit den von den Schutzgruppen befreiten Bereichen. Indem Schutzgruppen auf Bereichen des Substrats selektiv entfernt und vorbestimmte Monomere durch den Reaktionsraum geleitet werden, können gewünschte Polymere an bestimmten Stellen synthetisiert werden.

Verbesserte Nachweisvorrichtungen und -verfahren werden ebenfalls beschrieben. Das Nachweisverfahren und die

Nachweisvorrichtung betreffen ein Substrat, das eine Vielzahl von Polymersequenzen an bestimmten Stellen seiner Oberfläche aufweist. Das Substrat wird gegen einen Fluoreszenz-markierten Rezeptor exponiert, der eine oder mehrere der Polymersequenzen bindet. Das Substrat wird zur Identifizierung von Stellen, an denen eine Bindung erfolgt ist, in eine mikroskopische Nachweisvorrichtung gegeben. Die mikroskopische Nachweisvorrichtung schließt eine monochromatische oder polychromatische Lichtquelle ein, um das Substrat zu bestrahlen, das heißt, um fluoreszierendes Licht vom Substrat nachzuweisen und eine Stelle mit fluoreszierendem Licht festzustellen. Die Nachweisvorrichtung für fluoreszierendes Licht auf dem Substrat kann in einigen Ausführungsformen einen Photonenzähler einschließen. Die Vorrichtung zur Feststellung einer Stelle mit fluoreszierendem Licht kann einen x/y-Positioniertisch für das Substrat einschließen. Die Verschiebung des Objektträgers und die Datensammlung werden durch einen geeignet programmierten digitalen Computer aufgezeichnet und verwaltet.

Ein besseres Verständnis der Natur und der Vorteile der hier beschriebenen Erfindungen kann durch Bezugnahme auf den Rest der Beschreibung und der beigefügten Figuren erhalten werden.

Kurze Beschreibung der Figuren

Fig. 1 zeigt die Maskierung und Bestrahlung eines Substrats an einer ersten Stelle. Das Substrat ist im Querschnitt dargestellt.

Fig. 2 zeigt das Substrat nach dem Anknüpfen eines Monomers "A".

Fig. 3 zeigt die Bestrahlung des Substrats an einer zweiten Stelle.

Fig. 4 zeigt das Substrat nach dem Anknüpfen des Monomers "B".

Fig. 5 zeigt die Bestrahlung des Monomers "A".

Fig. 6 zeigt das Substrat nach dem zweiten Anknüpfen

von "B".

Fig. 7 zeigt ein vollständiges Substrat.

Figuren 8A und 8B zeigen alternative Ausführungsformen eines Reaktionssystems zur Bildung einer Vielzahl von Polymeren auf einem Substrat.

Fig. 9 zeigt eine Nachweisvorrichtung zur Lokalisierung von Stellen mit fluoreszierenden Markern auf dem Substrat.

Figuren 10A bis 10M zeigen das Verfahren, wie es zur Produktion der Trimere aus den Monomeren "A" und "B" verwendet wird.

Figuren 11A und 11B sind Fluoreszenzspuren für Standardfluoreszenzkügelchen.

Figuren 12A und 12B sind Fluoreszenzkurven für NVOC-Objektträger, die nicht bestrahlt bzw. dem Licht exponiert worden sind.

Figuren 13A und 13B zeigt die Bildung eines Objektträgers mit einem Damebrettmuster von YGGFL und GGFL, die markierten Herz-Antikörpern exponiert werden, und

Figuren 14A und 14B zeigen die Karte der sechzehn Sequenzen, die auf zwei unterschiedlichen Objektträgern aus Glas synthetisiert worden sind.

Genaue Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

Inhaltsverzeichnis

- I. Glossar
- II. Allgemeine Beschreibung
- III. Polymersynthese
- IV. Details einer Ausführungsform
eines Reaktionssystems
- V. Details einer Ausführungsform
eines Fluoreszenznachweissystems
- VI. Nachweis der relativen Bindungsstärke
von Rezeptoren
- VII. Beispiele

- A. Herstellung des Objektträgers
- B. Synthese von acht Trimeren
aus "A" und "B"
- C. Synthese eines Dimers aus einer
Aminopropylgruppe und einer
fluoreszierenden Gruppe
- D. Nachweis der Fähigkeit zur
Signalabgabe
- E. Nachweis der Zahl von Molekülen
pro Einheitsbereich
- F. Entfernung von NVOC und Anlagerung
eines Fluoreszenzmarkers
- G. Verwendung einer Maske bei der
Entfernung von NVOC
- H. Anlagerung von YGGFL und
anschließende Exponierung gegen
Herz- und
Ziegen-anti-Maus-Antikörper
- I. Monomer-Monomer-Bildung von YGGFL
und anschließende Exponierung
gegen markierte Antikörper
- J. Monomer-Monomer-Synthese von YGGFL
und PGGFL
- K. Monomer-Monomer-Synthese
von YGGFL und YPGGFL
- L. Synthese von sechzehn
verschiedenen Aminosäuresequenzen
und Bewertung der relativen
Bindungsaffinität gegen
Herz-Antikörper

VIII. Schlußfolgerung

I. Glossar

Die nachstehend beschriebenen Begriffe sollen die folgenden, hier verwendeten allgemeinen Bedeutungen besitzen:

1. Komplementär: Bezeichnet die topologische Kompatibilität oder das Zusammenpassen von miteinander in Wechselwirkung tretenden Oberflächen eines Ligandenmoleküls und seines Rezeptors. Daher können der Rezeptor und sein Ligand als komplementär beschrieben werden, und außerdem sind die Eigenschaften der Kontaktflächen komplementär zueinander.

2. Epitop: Der Teil eines Antigenmoleküls, der den Bereich der Wechselwirkung mit der Unterklasse von als Antikörper bezeichneten Rezeptoren darstellt.

3. Ligand: Ein Ligand ist ein Molekül, das durch einen bestimmten Rezeptor erkannt wird. Beispiele von Liganden, die durch diese Erfindung untersucht werden können, schließen Agonisten ein und Antagonisten für Zellmembranrezeptoren, Toxine und Gifte, virale Epitope, Hormone (z. B. Opiate, Steroide, etc.), Hormonrezeptoren, Peptide, Enzyme, Enzymsubstrate, Cofaktoren, Arzneimittel, Lectine, Zucker, Oligonucleotide, Nucleinsäuren, Oligosaccharide, Proteine und monoclonale Antikörper, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein.

4. Monomer: Ein Bestandteil des Satzes von kleinen Molekülen, der unter Bildung eines Polymers zusammengefügt werden kann. Der Satz von Monomeren schließt beispielsweise den Satz von üblichen L-Aminosäuren, den Satz von D-Aminosäuren, den Satz von synthetischen Aminosäuren, den Satz von Nucleotiden und den Satz von Pentosen und Hexosen ein, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein. Wie hier

verwendet, bezeichnet der Begriff Monomer jeden Bestandteil eines Basissatzes zur Synthese eines Polymers. Dimere von L-Aminosäuren bilden beispielsweise einen Basissatz von 400 Monomeren zur Synthese von Polypeptiden. Unterschiedliche Basissätze von Monomeren können in nacheinander durchgeführten Schritten zur Synthese eines Polymers verwendet werden.

5. Peptid: Ein Polymer, in dem die Monomere alpha-Aminosäuren sind und durch Amidbindungen zusammengehalten werden, und das alternativ als Polypeptid bezeichnet wird. Im Zusammenhang mit dieser Beschreibung soll darauf hingewiesen werden, daß das optische L- oder D-Isomer der Aminosäuren verwendet werden kann. Peptide weisen eine Länge von mehr als zwei und häufig mehr als 20 Aminosäuremonomere auf. Es werden die Standardabkürzungen für Aminosäuren (z. B. P für Prolin) verwendet. Für diese Abkürzungen vgl. Stryer, Biochemistry 3. Aufl. (1988), die hier durch Bezugnahme für alle Zwecke eingeschlossen ist.

6. Strahlung: Energie, die selektiv verwendet werden kann, wobei Energie mit einer Wellenlänge von 10^{-14} bis 10^4 Metern, sowie beispielsweise Elektronenstrahlung, Gammastrahlung, Röntgenstrahlung, ultraviolette Strahlung, sichtbares Licht, Infrarotstrahlung, Mikrowellenstrahlung und Radiowellen eingeschlossen sind. Bei einer "Bestrahlung" wird eine Strahlung auf eine Oberfläche gerichtet.

7. Rezeptor: Ein Molekül, das eine Affinität für einen bestimmten Liganden aufweist. Die Rezeptoren können natürlich vorkommen oder synthetisch hergestellt sein. Sie können außerdem in ihrem unveränderten Zustand oder als Aggregate mit anderen Molekülen verwendet werden. Die Rezeptoren können kovalent oder nichtkovalent an einen bindenden Bestandteil entweder direkt oder mittels einer spezifisch bindenden Substanz gebunden werden. Beispiele von Rezeptoren, die in dieser Erfindung verwendet werden können,

sind, jedoch ohne Beschränkung darauf, Antikörper, Zellmembranrezeptoren, monoclonale Antikörper und Antiseren, die mit spezifischen antigenen Determinanten reagieren (beispielsweise mit Viren, Zellen oder anderen Materialien), Arzneimittel, Polynucleotide, Nucleinsäuren, Peptide, Cofaktoren, Lectine, Zucker, Polysaccharide, Zellen, Zellmembranen und Organellen. Die Rezeptoren werden im Stand der Technik gelegentlich als Antiliganden bezeichnet. Der Begriff Rezeptor hier mit der gleichen Bedeutung verwendet. Ein "Ligand-Rezeptor-Paar" bildet sich, wenn zwei Makromoleküle durch molekulare Erkennung unter Bildung eines Komplexes kombiniert werden.

Weitere Beispiele von Rezeptoren, die mit dieser Erfindung untersucht werden können, sind, jedoch ohne Beschränkung darauf:

a) Mikroorganismus-Rezeptoren: Die Ermittlung von Liganden, die an Rezeptoren binden, beispielsweise an spezifische Transportproteine oder -enzyme, die für das Überleben der Mikroorganismen essentiell sind, kann zur Entwicklung einer neuen Klasse von Antibiotika verwendet werden. Von besonderem Wert sind Antibiotika gegen opportunistische Pilze, Protozoen und Bakterien, die gegen die gegenwärtig verwendeten Antibiotika resistent sind.

b) Enzyme: Beispielsweise die Bindungsstelle von Enzymen, beispielsweise die Enzyme, die für die Spaltung von Neurotransmittern verantwortlich sind; Bestimmung von Liganden, die bestimmte Rezeptoren binden, wobei die Wirkung der Enzyme, die die unterschiedlichen Neurotransmitter spalten, moduliert wird, kann zur Entwicklung von Arzneimitteln verwendet werden, die zur Behandlung von Störungen der Neurotransmission verwendet werden können.

c) Antikörper: Beispielsweise kann die Erfindung für die Untersuchung der Ligand-Bindungsstelle auf dem Antikörpermolekül, die das Epitop eines bestimmten Antigens bindet,

nützlich sein; durch die Bestimmung einer einem antigenen Epitop nachgebildeten Sequenz können Impfstoffe, die eine oder mehrere dieser Sequenzen des Immunogens enthalten, oder verwandte diagnostische Wirkstoffe oder Verbindungen entwickelt werden, die für therapeutische Behandlungen nützlich sind, beispielsweise für Autoimmunkrankheiten (z. B. durch Blockierung der Bindung der eigenen Antikörper).

d) Nucleinsäuren: Nucleinsäuresequenzen können zur Herstellung von DNA- oder RNA-bindenden Sequenzen synthetisiert werden.

e) Katalytische Polypeptide: Polymere, vorzugsweise Polypeptide, die eine chemische Umsetzung fördern können, in der ein oder mehrere Reaktanten in ein oder mehrere Produkte umgewandelt werden. Derartige Polypeptide schließen üblicherweise eine Bindungsstelle ein, die für mindestens einen Reaktanten oder ein Reaktionszwischenprodukt spezifisch ist, und einen aktiven funktionellen Nachbarn zur Bindungsstelle, dessen Wirkung den gebundenen Reaktanten chemisch modifizieren kann. Katalytische Polypeptide werden beispielsweise in der US-Anmeldung mit der fortlaufenden Nr. 404,920, beschrieben, die hier durch Bezugnahme für alle Zwecke eingeschlossen ist.

f) Hormon-Rezeptoren: Beispielsweise die Rezeptoren für Insulin und das Wachstumshormon. Die Ermittlung der Liganden, die mit hoher Affinität einen Rezeptor binden, kann beispielsweise zur Entwicklung eines oralen Ersatzes für die täglichen Injektionen, die Diabetiker zur Linderung der Symptome von Diabetes einnehmen müssen, und im anderen Fall eines Ersatzes für das seltene menschliche Wachstumshormon verwendet werden, das nur von Leichen oder durch DNA-Rekombinationsverfahren erhalten werden kann. Weitere Beispiele sind die vasokonstriktiven Hormon-Rezeptoren; durch eine Ermittlung der Liganden, die einen Rezeptor binden, können Arzneimittel zur Kontrolle des Blutdrucks

entwickelt werden.

g) Opiat-Rezeptoren: Durch die Ermittlung von Liganden, die die Opiat-Rezeptoren im Gehirn binden, können weniger süchtig machende Ersatzstoffe für Morphin und verwandte Drogen entwickelt werden.

8. Substrat: Ein Material mit einer festen oder halbfesten Oberfläche. In vielen Ausführungsformen ist mindestens eine Oberfläche des Substrats im wesentlichen flach, obwohl es in einigen Ausführungsformen wünschenswert sein kann, die Synthesebereiche für verschiedene Polymere beispielsweise durch Vertiefungen, erhöhte Bereiche, kantige Rillen oder ähnliches physikalisch zu trennen. Gemäß anderen Ausführungsformen kann die Oberfläche kleine Kügelchen aufweisen, die nach Abschluß der Synthese freigesetzt werden können.

9. Schutzgruppe: Ein Material, das an die Monomereinheit gebunden und nach der selektiven Exponierung gegen einen Aktivator, beispielsweise elektromagnetische Strahlung, räumlich entfernt werden kann. Beispiele für Schutzgruppen, die hier nützlich sind, sind Nitroveratryloxycarbonyl, Nitrobenzyloxycarbonyl, Dimethyldimethoxybenzyloxycarbonyl, 5-Bröm-7-nitroindoliny, o-Hydroxy- α -methylcinnamoyl und 2-Oxymethylenanthrachinon. Weitere Beispiele für Aktivatoren sind Ionenstrahlen, elektrische Felder, magnetische Felder, Elektronenstrahlen, Röntgenstrahlen, etc..

10. Vorbestimmter Bereich: Ein vorbestimmter Bereich ist ein lokalisierter Bereich auf der Oberfläche, der zur Bildung eines Polymers aktiviert ist, war oder werden soll. Der vorbestimmte Bereich kann jede geeignete Form, z. B. eine kreisförmige, rechteckige, elliptische, keilförmige, etc., aufweisen. Zur Abkürzung werden hier "vorbestimmte Bereiche" gelegentlich einfach als "Bereiche" bezeichnet.

11. Im wesentlichen rein: Es wird davon ausgegangen, daß ein Polymer innerhalb eines vorbestimmten Bereichs eines Substrats "im wesentlichen rein" ist, wenn er Eigenschaften zeigt, die ihn von anderen vorbestimmten Bereichen unterscheiden. Üblicherweise wird die Reinheit im Hinblick auf die biologische Aktivität oder Funktion als Ergebnis einer einheitlichen Sequenz gemessen. Derartige Eigenschaften werden üblicherweise durch Bindung an einen ausgewählten Liganden oder Rezeptor ermittelt.

II. Allgemeine Beschreibung

Die vorliegende Erfindung stellt Verfahren und eine Vorrichtung zur Herstellung und Verwendung eines Substrats bereit, das zahlreiche Polymersequenzen in vorbestimmten Bereichen aufweist. Die Erfindung wird hier primär im Hinblick auf die Herstellung von Molekülen beschrieben, die Aminosäuresequenzen enthalten, sie kann jedoch auch zur Herstellung von anderen Polymeren verwendet werden. Beispiele für derartige Polymere sind sowohl lineare als auch zyklische Polymere von Nucleinsäuren, Polysacchariden, Phospholipiden und Peptiden, die entweder α -, β - oder ω -Aminosäuren aufweisen, Heteropolymere, in denen ein bekanntes Arzneimittel kovalent an jede der vorstehend beschriebenen Verbindungen gebunden ist, Polyurethane, Polyester, Polycarbonate, Polyharnstoffe, Polyamide, Polyethylenimine, Polyarylsulfide, Polysiloxane, Polyimide, Polyacetate oder andere Polymere, die in dieser Zusammenfassung der Erfindung beschrieben werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die hier beschriebene Erfindung zur Synthese von Peptiden verwendet.

Das hergestellte Substrat kann beispielsweise für das Screening einer Vielzahl von Polymeren als Liganden auf eine Bindung mit einem Rezeptor verwendet werden, obwohl es erkennbar ist, daß die Erfindung auch zur Synthese eines Rezeptors zur Bindung mit einem Liganden verwendet werden

kann. Das hier beschriebene Substrat weist zahlreiche andere Verwendungen auf. Die hier beschriebene Erfindung kann beispielsweise zur Ermittlung von Peptid- und Nucleinsäuresequenzen, die Proteine binden, zur Suche nach Sequenzspezifisch bindenden Arzneimitteln, Identifizierung von durch Antikörper erkannten Epitopen und Bewertung zahlreicher Arzneimittel für klinische und diagnostische Verwendungen sowie Kombinationen des vorstehend beschriebenen verwendet werden.

Die Erfindung betrifft vorzugsweise die Verwendung eines Substrats "S" mit einer Oberfläche. Die Linkermoleküle "L" werden gegebenenfalls auf einer Oberfläche des Substrats bereitgestellt. Die Linkermoleküle sollen in einigen Ausführungsformen die Rezeptorerkennung der synthetisierten Polymere erleichtern.

Die Linkermoleküle können zur Aufbewahrung gegebenenfalls chemisch geschützt werden. Eine chemische Schutzgruppe, wie beispielsweise t-BOC (t-Butoxycarbonyl), zur Aufbewahrung kann in einigen Ausführungsformen verwendet werden. Derartige chemische Schutzgruppen können nach einer Exponierung gegen beispielsweise eine saure Lösung chemisch entfernt werden, sollen die Oberfläche während der Aufbewahrung schützen und werden vor der Herstellung des Polymers entfernt.

Das Substrat oder ein distales Ende der Linkermoleküle weist eine funktionelle Gruppe mit einer Schutzgruppe P_0 auf. Die Schutzgruppe P_0 kann durch Bestrahlung entfernt werden.

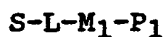
In einer bevorzugten Ausführungsform wird ultraviolette (UV) oder infrarote (IR) Strahlung oder sichtbares Licht verwendet. In weiteren alternativen Ausführungsformen können Ionenstrahlen, Elektronenstrahlen, etc. verwendet werden, um die Schutzgruppe zu entfernen.

In einigen Ausführungsformen sind die exponierten Bereiche und damit der Bereich, auf dem jede einzelne Polymersequenz synthetisiert wird, kleiner als etwa 1 cm^2 oder kleiner als 1 mm^2 . In bevorzugten Ausführungsformen ist

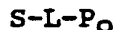
der exponierte Bereich kleiner als etwa $10\,000\ \mu\text{m}^2$ oder stärker bevorzugt kleiner als $100\ \mu\text{m}^2$ und kann in einigen Ausführungsformen sogar die Bindungsstelle für ein einzelnes Molekül umfassen. Innerhalb dieser Bereiche wird jedes Polymer vorzugsweise in einer im wesentlichen reinen Form synthetisiert.

Gleichzeitig mit oder nach der Bestrahlung eines bestimmten Bereichs des Substrats wird die Oberfläche mit einer ersten Monomereinheit M_1 , die mit der funktionellen Gruppe reagiert, die durch den Schritt der Entfernung der Schutzgruppe exponiert worden war, in Kontakt gebracht. Das erste Monomer schließt eine Schutzgruppe P_1 ein. P_1 kann oder kann nicht die gleiche Schutzgruppe wie P_0 sein.

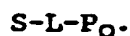
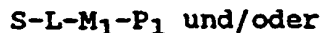
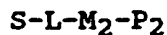
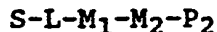
Daher können nach einem ersten Zyklus bekannte erste Bereiche der Oberfläche die Sequenz



umfassen, während unveränderte Bereiche der Oberfläche die Sequenz

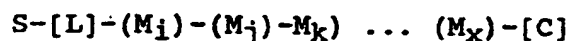


umfassen. Anschließend werden zweite Bereiche der Oberfläche (die den ersten Bereich einschließen können) dem Licht ausgesetzt und mit einem zweiten Monomer M_2 (der das gleiche oder nicht das gleiche Monomer wie M_1 sein kann) mit einer Schutzgruppe P_2 in Kontakt gebracht. P_2 kann die gleiche oder nicht die gleiche Schutzgruppe wie P_0 und P_1 sein. Nach diesem zweiten Zyklus können verschiedene Bereiche des Substrats eine oder mehrere der nachstehenden Sequenzen umfassen:



Das vorstehende Verfahren wird wiederholt bis das Substrat die gewünschten Polymere der gewünschten Längen einschließt. Durch eine Kontrolle der Stellen des Substrats, die dem Licht exponiert werden, und der Reagenzien, denen das Substrat nach der Exponierung ausgesetzt wird, ist die Stelle jeder Sequenz bekannt.

Anschließend werden die Schutzgruppen von einem Teil oder dem gesamten Substrat entfernt und die Sequenzen gegebenenfalls mit einer Einheit C am Ende versehen. Das Verfahren führt zu einem Substrat, das eine Oberfläche mit einer Vielzahl von Polymeren der nachstehenden allgemeinen Formel



aufweist, in der durch eckige Klammern optionale Gruppen angezeigt werden und $M_1 \dots M_x$ beliebige Monomersequenzen anzeigen. Es kann eine unterschiedliche Zahl von Monomeren verwendet werden, in einer bevorzugten Ausführungsform sind es jedoch zwischen 2 und 100.

In einigen Ausführungsformen enthält eine Vielzahl von Stellen auf den Substrat-Polymeren eine gemeinsame monomere Subsequenz. Es kann beispielsweise erwünscht sein, eine Sequenz $S-M_1-M_2-M_3$ an ersten Stellen und eine Sequenz $S-M_4-M_2-M_3$ an zweiten Stellen zu synthetisieren. Das Verfahren beginnt mit der Bestrahlung der ersten Stellen, wonach M_1-P eingesetzt wird, um an der ersten Stelle die Sequenz $S-M_1-P$ zu erhalten. Die zweiten Stellen werden anschließend bestrahlt und mit M_4-P in Kontakt gebracht, um an zweiten Stellen die Sequenz $S-M_4-P$ zu erhalten. Anschließend werden sowohl die ersten als auch die zweiten Stellen bestrahlt und mit dem Dimer M_2-M_3 in Kontakt gebracht, um an den ersten Stellen die Sequenz $S-M_1-M_2-M_3$ und an den zweiten Stellen $S-M_4-M_2-M_3$ zu erhalten. Es können selbstverständlich gemeinsame Untersequenzen von jeder Länge verwendet werden, wobei sie etwa 2 oder mehr Monomere, 2 bis

100 Monomere, 2 bis 20 Monomere und am stärksten bevorzugt etwa 2 bis 3 Monomere einschließen.

Gemäß anderen Ausführungsformen wird ein Satz von Masken für die erste Monomerschicht verwendet, und anschließend werden verschiedene Wellenlängen des Lichts zur selektiven Entfernung der Schutzgruppen verwendet. Im vorstehend beschriebenen Verfahren werden beispielsweise die ersten Bereiche zuerst durch eine Maske bestrahlt und mit einem ersten Monomer umgesetzt, das eine erste Schutzgruppe P_1 aufweist, die durch Bestrahlung mit Licht einer ersten Wellenlänge (z. B. IR) entfernt werden kann. Zweite Bereiche werden mit einem zweiten Monomer, das eine zweite Schutzgruppe P_2 aufweist, die durch Bestrahlung mit Licht einer zweiten Wellenlänge (z. B. UV) entfernt werden kann, maskiert und umgesetzt. Anschließend sind die Masken zur Synthese nicht mehr erforderlich, da das gesamte Substrat abwechselnd mit Licht der ersten und zweiten Wellenlänge im Zyklus der Entfernung der Schutzgruppen bestrahlt werden kann.

Die gemäß den vorstehend beschriebenen Verfahren auf einem Substrat hergestellten Polymere können vielfältig verwendet werden, wobei beispielsweise das Screening auf eine biologische Aktivität eingeschlossen ist. In derartigen Screening-Aktivitäten wird das die Sequenzen enthaltende Substrat gegen einen nichtmarkierten oder markierten Rezeptor, wie beispielsweise gegen einen Antikörper, Rezeptor auf einer Zelle, ein Phospholipidvesikel oder einen von einer Vielzahl anderer Rezeptoren, exponiert. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Polymere gegen einen gewünschten ersten nichtmarkierten Rezeptor und anschließend gegen ein markiertes Rezeptor-spezifisches Erkennungselement, das beispielsweise ein Antikörper sein kann, exponiert. Dieses Verfahren erhöht im Nachweisstadium die Signalwirkung.

Die Rezeptormoleküle können ein oder mehrere Polymere auf dem Substrat binden. Die Gegenwart des markierten Rezeptors und somit die Gegenwart einer Sequenz, die den Rezeptor bindet, wird in einer bevorzugten Ausführungsform

unter Verwendung der Autoradiographie, der Fluoreszenz mit einer Entladungs-gekuppelten Vorrichtung, einem Fluoreszenzmikroskop, etc. nachgewiesen. Die Sequenz des Polymers an den Stellen, an denen die Rezeptorbindung nachgewiesen wird, kann verwendet werden, um die gesamte oder einen Teil einer zum Rezeptor komplementären Sequenz zu ermitteln.

Die Verwendung der hier beschriebenen Erfindung wird primär im Hinblick auf das Screening auf eine biologische Aktivität erläutert. Die Erfindung weist jedoch zahlreiche andere Verwendungen auf. Die Erfindung kann beispielsweise zur Speicherung von Information (z. B. auf optischen Platten), Herstellung von molekularen elektronischen Vorrichtungen, Herstellung von stationären Phasen für Trennungsvorfahren, Herstellung von Farbstoffen und Wirkstoffen zur Aufhellung, für die Photographie und zur Immobilisierung von Zellen, Proteinen, Lectinen, Nucleinsäuren, Polysacchariden, etc. in Mustern auf einer Oberfläche mittels der molekularen Erkennung von spezifischen Polymersequenzen verwendet werden. Durch Synthese der gleichen Verbindung in benachbarten, wachsend unterschiedlichen Konzentrationen wird ein Gradient etabliert, um eine Chemotaxis zu kontrollieren oder diagnostische Tauchstäbchen zu entwickeln, die beispielsweise einen Antikörper gegen eine steigende Menge Antigen titrieren. Durch eine Synthese von mehreren katalytischen Molekülen in engster Nachbarschaft können durch eine "koordinierte Immobilisierung" Umwandlungen, für die viele Schritte erforderlich sind, effizienter durchgeführt werden. Die koordinierte Immobilisierung kann auch für Elektronentransfersysteme, sowie zur Bereitstellung sowohl von struktureller Integrität als auch anderer gewünschter Eigenschaften an Materialien, beispielsweise Schmierung, Benetzung, etc., verwendet werden.

Gemäß alternativer Ausführungsformen können die biologische Verteilung der Moleküle oder pharmakokinetische Eigenschaften untersucht werden. Beispielsweise können zur Ermittlung der Resistenz gegen Darm- oder Serum-Proteasen die Polymere mit einer fluoreszierenden Markierung versehen

und gegen bestimmte biologische Flüssigkeiten exponiert werden.

III. Polymersynthese

Fig. 1 erläutert eine hier beschriebene erfindungsgemäße Ausführungsform, in der ein Substrat 2 im Querschnitt gezeigt ist. Im wesentlichen kann in der Erfindung jedes denkbare Substrat verwendet werden. Das Substrat kann biologisch, nichtbiologisch, organisch, anorganisch oder eine Kombination davon sein, wobei es als Partikel, Stränge, Niederschläge, Gele, Schichten, Röhre, Kügelchen, Behälter, Kapillaren, Bausche, Scheiben, Filme, Platten, Spangen, etc. vorkommt. Das Substrat kann jede geeignete Form aufweisen, beispielsweise eine Scheibe, ein Viereck, Kügelchen, Kreis etc. sein. Das Substrat ist vorzugsweise flach, kann jedoch zahlreiche alternative Oberflächenkonfigurationen aufweisen. Das Substrat kann beispielsweise erhöhte oder vertiefte Bereiche zur Synthese aufweisen. Das Substrat und seine Oberfläche bilden vorzugsweise einen festen Träger, auf dem die hier beschriebenen Umsetzungen durchgeführt werden. Das Substrat und seine Oberfläche werden außerdem so ausgewählt, daß sie geeignete Licht-absorbierende Eigenschaften aufweisen. Das Substrat kann beispielsweise ein polymerisierter Langmuir-Blodgett-Film, funktionalisiertes Glas, Si, Ge, GaAs, GaP, SiO₂, SiN₄, ein modifiziertes Silikon oder eines von zahlreichen Gelen oder Polymeren, beispielsweise (Poly)tetrafluorethylen, (Poly)vinylidendifluorid, Polystyrol, Polycarbonat oder Kombinationen davon, sein. Weitere Substratmaterialien werden für den Fachmann nach der Lektüre dieser Beschreibung ersichtlich sein. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Substrat flaches Glas oder eine einkristalline Silikonschicht mit reliefartigen Oberflächenstrukturen von weniger als 10 Å.

Gemäß einigen Ausführungsformen wird die Oberfläche des Substrats unter Verwendung von üblichen Verfahren mit Kanten versehen, um die gewünschten Oberflächenkonturen be-

reitzustellen. Durch Bildung von Rillen, V-Rinnen, Tafelstrukturen, etc. können die Synthesebereiche beispielsweise näher am Brennpunkt des einfallenden Lichts liegen, mit reflektierenden "Spiegel"-Strukturen zur Maximierung der Lichtsammlung aus fluoreszierenden Quellen ausgestattet sein, etc..

Die Oberflächen auf dem festen Substrat werden üblicherweise, jedoch nicht immer, aus dem gleichen Material wie das Substrat bestehen. Daher kann die Oberfläche aus einem von einer Vielzahl von Materialien bestehen, beispielsweise aus Polymeren, Plastikprodukten, Harzen, Polysacchariden, Kieselgel oder Materialien auf Kieselgel-Grundlage, Kohlenstoff, Metallen, anorganischen Gläsern, Membranen oder einem der vorstehend beschriebenen Substratmaterialien. Die Oberfläche wird vorzugsweise reaktive Gruppen, beispielsweise Carboxyl-, Amino-, Hydroxylgruppen etc., enthalten. Die Oberfläche ist am stärksten bevorzugt optisch transparent und weist Si-OH-Funktionen auf, beispielsweise wie bei Siliziumdioxidoberflächen.

Die Oberfläche 4 des Substrats weist vorzugsweise eine Schicht der Linkermoleküle 6 auf, obwohl es selbstverständlich ist, daß die Linkermoleküle keine Elemente darstellen, die erfindungsgemäß erforderlich sind. Die Linkermoleküle weisen vorzugsweise eine ausreichende Länge auf, damit Polymere in einem vollständigen Substrat frei mit den gegen das Substrat exponierten Molekülen in Wechselwirkung treten können. Die Linkermoleküle weisen eine Länge von 6 bis 50 Atome auf, um eine ausreichende Exponierung zu ermöglichen. Die Linkermoleküle können beispielsweise Arylacetylen, 2 bis 10 monomere Einheiten enthaltende Ethylen-glycol-Oligomere, Diamine, Disäuren, Aminosäuren oder Kombinationen davon sein. Es können andere Linkermoleküle im Zusammenhang mit dieser Beschreibung verwendet werden.

Gemäß alternativen Ausführungsformen werden die Linkermoleküle aufgrund ihrer hydrophilen/hydrophoben Eigenschaften ausgewählt, um die Präsentierung von synthetisierten Polymeren für bestimmte Rezeptoren zu verbessern.

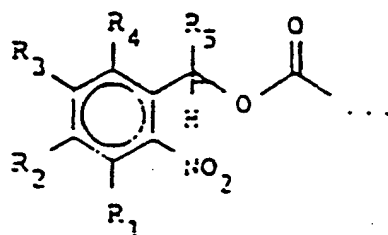
Bei einem hydrophilen Rezeptor werden beispielsweise hydrophile Linkermoleküle bevorzugt, damit sich der Rezeptor dem synthetisierten Polymer stärker nähern kann.

Gemäß einer anderen alternativen Ausführungsform weisen Linkermoleküle außerdem eine durch Bestrahlung entfernbare Gruppe an einem Zwischenbereich auf. Die durch Bestrahlung entfernbare Gruppe wird vorzugsweise bei einer von der Schutzgruppe abweichenden Wellenlänge abgespalten. Dies ermöglicht die Entfernung der verschiedenen Polymere nach Abschluß der Synthese durch Bestrahlung mit Licht unterschiedlicher Wellenlängen.

Die Linkermoleküle können mittels Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen unter Verwendung von beispielsweise (Poly)trifluorchlorethylenoberflächen oder vorzugsweise durch Siloxanbindungen (unter Verwendung von beispielsweise Glas- oder Siliziumoxidoberflächen) an das Substrat gebunden sein. Die Siloxanbindungen mit der Oberfläche des Substrats können in einer Ausführungsform durch Umsetzungen von Trichlorsilylgruppen tragenden Linkermolekülen gebildet werden. Die Linkermoleküle können gegebenenfalls in einer geordneten Reihenfolge, d. h., als Teile der Kopfgruppen in einem polymerisierten Langmuir-Blodgett-Film, gebunden sein. In alternativen Ausführungsformen sind die Linkermoleküle an der Oberfläche des Substrats adsorbiert.

Die hier verwendeten Linkermoleküle und Monomere weisen eine funktionelle Gruppe auf, an die eine Schutzgruppe gebunden ist. Die Schutzgruppe ist vorzugsweise am distalen Ende oder Terminus des Linkermoleküls gegenüber dem Substrat. Die Schutzgruppe kann entweder eine negative Schutzgruppe (d. h., die Schutzgruppe vermindert die Reaktionsbereitschaft der Linkermoleküle bei einer Exponierung gegen ein Monomer) oder eine positive Schutzgruppe (d. h., die Schutzgruppe erhöht die Reaktionsbereitschaft der Linkermoleküle bei einer Exponierung gegen ein Monomer) sein. Bei negativen Schutzgruppen ist ein weiterer Reaktivierungsschritt erforderlich. In einigen Ausführungsformen wird erhitzt.

Die Schutzgruppe auf den Linkermolekülen und den Monomeren kann aus einer Vielzahl von positiven, mit Licht reagierenden Gruppen ausgewählt werden, die vorzugsweise nitroaromatische Verbindungen, beispielsweise o-Nitrobenzyl-derivate, oder Benzylsulfonyl einschließen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird 6-Nitroveratryloxycarbonyl (NVOC), 2-Nitrobenzyloxycarbonyl (NBOC) oder α,α -Dimethyldimethoxybenzyloxycarbonyl (DDZ) verwendet. In einer Ausführungsform wird ein Benzylwasserstoff in ortho-Stellung zur Nitro-Gruppe verwendet, d. h., eine Chemikalie der Form:



in der R_1 ein Alkoxy- oder Alkylrest, ein Halogenatom, ein Aryl- oder ein Alkenylrest oder ein Wasserstoffatom, R_2 ein Alkoxy- oder Alkylrest, ein Halogenatom, ein Arylrest, eine Nitrogruppe oder ein Wasserstoffatom, R_3 ein Alkoxy- oder Alkylrest, ein Halogenatom, eine Nitrogruppe, ein Arylrest, oder ein Wasserstoffatom, R_4 ein Alkoxy- oder Alkylrest, ein Wasserstoffatom, ein Arylrest, ein Halogenatom oder eine Nitrogruppe und R_5 ein Alkyl- oder Alkenylrest, eine Cyanogruppe, ein Alkoxyrest, ein Wasserstoff- oder Halogenatom; ein Aryl- oder Alkenylrest ist. Beispiele für weitere verwendbare Materialien sind o-Hydroxy- α -methylcinnamoyl-Derivate. Schutzgruppen, die durch Bestrahlung entfernbare sind, werden beispielsweise von Patchornik, J. Am. Chem. Soc. 92 (1970), 6333, und Amit et al., J. Org. Chem. 39 (1974), 192, beschrieben, die hier durch Bezugnahme eingeschlossen sind.

In einer alternativen Ausführungsform wird zur Umsetzung mit Reagenzien die positiv reaktive Gruppe in Lösung aktiviert. Eine an ein Carbonyl gebundene 5-Brom-7-nitroindolin-Gruppe reagiert nach der Exponierung gegen

Licht bei 420 nm.

In einer zweiten alternativen Ausführungsform wird die reaktive Gruppe auf dem Linkermolekül aus einer Vielzahl von negativen Licht-reaktiven Gruppen, die eine Cinnamatgruppe einschließen, ausgewählt.

In einer anderen Ausführungsform wird die reaktive Gruppe durch Elektronenstrahl-Lithographie, Röntgen-Lithographie oder mit einer anderen Strahlung aktiviert oder deaktiviert. Geeignete reaktive Gruppen zur Elektronenstrahl-Lithographie, schließen Sulfonylgruppen ein. Es können andere reaktive Gruppen und Aktivierungsverfahren im Zusammenhang mit dieser Erfindung verwendet werden.

Wie in Fig. 1 dargestellt, werden die Linkermoleküle vorzugsweise beispielsweise durch eine geeignete Maske 8 mit Licht bestrahlt unter Verwendung von photolithographischen Verfahren der in der Halbleiterindustrie bekannten Art, die beispielsweise in Sze, VLSI Technology, McGraw-Hill (1983) und Mead et al., Introduction to VLSI Systems, Addison-Wesley (1980), die hier durch Bezugnahme für alle Zwecke mit eingeschlossen sind, beschrieben sind. Das Licht kann entweder auf die die Schutzgruppen enthaltende Oberfläche oder auf die Rückseite des Substrats gerichtet werden, sofern das Substrat für die zur Entfernung der Schutzgruppen erforderlichen Wellenlänge des Lichts transparent ist. In der in Fig. 1 dargestellten Ausführungsform wird Licht auf die Oberfläche des die Schutzgruppen enthaltenden Substrats gerichtet. Fig. 1 erläutert die Verwendung derartiger Maskierungsverfahren, wie sie bei einer positiv-reaktiven Gruppe verwendet werden, um das Linkermolekül zu aktivieren und funktionelle Gruppen in den Bereichen 10a und 10b zu exponieren.

Die Maske 8 ist in einer Ausführungsform eine transparente Materialhalterung, die selektiv mit einer Schicht aus undurchsichtigem Material beschichtet ist. Teile des undurchsichtigen Materials werden entfernt, wobei undurchsichtiges Material im auf der Substratoberfläche gewünschten genauen Muster verbleibt. Die Maske wird, wie in Fig. 1

dargestellt, nahe an die Oberfläche des Substrats gebracht, darauf projiziert oder mit ihr direkt in Kontakt gebracht. "Öffnungen" in der Maske entsprechen den Stellen auf dem Substrat, an denen die durch Bestrahlung entfernbaren Schutzgruppen vom Substrat entfernt werden sollen. Die Ausrichtung kann unter Verwendung von üblichen Ausrichtungsverfahren, in denen Ausrichtungsmarkierungen (nicht dargestellt) verwendet werden, um nachfolgende Masken genau über die zuvor erzeugten Muster zu legen, oder komplizierteren Verfahren durchgeführt werden. Es können beispielsweise Interferometerverfahren verwendet werden, die beispielsweise von Flanders et al., in "A New Interferometric Alignment Technique", App. Phys. Lett. 31 (1977), 426-428, beschrieben und hier durch Bezugnahme mit eingeschlossen sind.

Zur Verbesserung des Kontrastes des bestrahlten Substrats ist es gemäß einigen Ausführungsformen wünschenswert, Kontrastverstärkungsmittel zwischen der Maske und dem Substrat bereitzustellen. Diese Kontrastverstärkungsschicht kann ein Molekül umfassen, das durch Licht abgebaut wird, beispielsweise Chinondiazid, oder ein Material, das durch bestimmte Wellenlängen vorübergehend gebleicht wird. Das vorübergehende Bleichen von Materialien ermöglicht in den Bereichen, in denen Licht verwendet wird, ein besseres Eindringen des Lichts, wodurch der Kontrast verbessert wird. In einer anderen Ausführungsform kann die Verbesserung des Kontrastes mittels eines optischen Verbundfaserbündels bereitgestellt werden.

Das Licht kann von einer üblichen Glühbirne, einem Laser, einer Laserdiode oder ähnlichem stammen. Wenn nicht-ausgeblendete Lichtquellen verwendet werden, kann es wünschenswert sein, eine dick- oder vielschichtige Maske zu verwenden, um eine Verteilung des Lichts auf dem Substrat zu verhindern. Es kann ferner in einigen Ausführungsformen wünschenswert sein, zur Kontrolle der Synthese Gruppen zu verwenden, die für verschiedene Wellenlängen empfindlich sind. Durch Verwendung von Gruppen, die für verschiedene Wellenlängen empfindlich sind, ist es beispielsweise mög-

lich, Verzweigungspositionen bei der Synthese eines Polymers auszuwählen oder bestimmte Maskierungsschritte zu eliminieren. Mehrere reaktive Gruppen zusammen mit ihren zur Entfernung der Schutzgruppen erforderlichen Wellenlängen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1

<u>Gruppe</u>	<u>Ungefähre Wellenlänge zur Entfernung der Schutzgruppen</u>
Nitroveratryloxycarbonyl (NVOC)	UV (300-400 nm)
Nitrobenzyloxycarbonyl (HBOC)	UV (300-350 nm)
Dimethyldimethoxybenzyloxycarbonyl	UV (280-300 nm)
5-Brom-7-nitroindolinyI	UV (420 nm)
o-Hydroxy- α -methylcinnamoyl	UV (300-350 nm)
<u>2-Oxymethylenanthrachinon</u>	<u>UV (350 nm)</u>

Während die Erfindung hier primär unter Verwendung einer Maske zur Bestrahlung ausgewählter Bereiche des Substrats erläutert wird, können auch andere Verfahren verwendet werden. Das Substrat kann beispielsweise unter einer modulierten Laser- oder einer Dioden-Lichtquelle verschoben werden. Derartige Verfahren sind beispielsweise im US-Patent Nr. 4,719,615 (Feyrer et al.), das hier durch Bezugnahme eingeschlossen ist, beschrieben. In alternativen Ausführungsformen wird eine galvanometrische Laserabtastvorrichtung verwendet. In anderen Ausführungsformen kann die Synthese auf oder im Kontakt mit einem üblichen Flüssigkristall (hier nachstehend als "Lichtventil" bezeichnet) oder Lichtquellen aus optischen Fasern stattfinden. Durch eine geeignete Modulierung von Flüssigkristallen kann Licht selektiv gesteuert werden, damit Licht mit ausgewählten Bereichen des Substrats in Kontakt gebracht werden kann. In einer anderen Ausführungsform kann die Synthese am Ende einer Reihe von optischen Fasern statt-

finden, die mit Licht selektiv bestrahlt werden. Weitere Verfahren zur Kontrolle der Stelle der Bestrahlung sind dem Fachmann vertraut.

Das Substrat kann entweder in Kontakt oder nicht in Kontakt mit einer Lösung (nicht dargestellt) bestrahlt werden und wird vorzugsweise in Kontakt mit einer Lösung bestrahlt. Die Lösung enthält Reagenzien, um zu verhindern, daß die durch Bestrahlung gebildeten Nebenprodukte die Synthese des Polymers gemäß mehreren Ausführungsformen behindern. Beispiele derartiger Nebenprodukte sind Kohlendioxid, Nitrosocarbonylverbindungen, Styrol-derivate, Indol-derivate und Produkte ihrer photochemischen Reaktionen. In einer anderen Ausführungsform kann die Lösung Reagenzien enthalten, die verwendet werden, um den Brechungsindex des Substrats zu erreichen. Die der Lösung zugesetzten Reagenzien können außerdem beispielsweise saure oder basische Puffer, Thiole, substituierte Hydrazine und Hydroxylamine, Reduktionsmittel (z. B. NADH) oder Reagenzien, die bekanntermaßen mit einer bestimmten funktionellen Gruppe reagieren (z. B. Arylnitroso + Glyoxylsäure \rightarrow Arylformhydroxamat + CO₂) einschließen.

Entweder gleichzeitig oder nach dem Bestrahlungsschritt werden die Linkermoleküle gewaschen oder auf andere Weise mit einem ersten Monomer, das in Fig. 2 durch "A" in den Bereichen 12a und 12b dargestellt ist, in Kontakt gebracht. Das erste Monomer reagiert mit den aktivierten funktionellen Gruppen der bestrahlten Linkermoleküle. Das erste Monomer, das vorzugsweise eine Aminosäure ist, weist ebenfalls eine durch Bestrahlung entfernbare Schutzgruppe auf. Die durch Bestrahlung entfernbare Schutzgruppe auf dem Monomer kann die gleiche oder eine andere Schutzgruppe als die in den Linkermolekülen verwendete und aus einer der vorstehend beschriebenen Schutzgruppen ausgewählt sein. In einer Ausführungsform werden die Schutzgruppen für das A-Monomer aus der Gruppe NBOC und NVOC ausgewählt.

Wie in Fig. 3 dargestellt, wird das Verfahren der Bestrahlung anschließend mit einer Maske wiederholt, die

erneut positioniert wurde, um die Schutzgruppen der Linker zu entfernen und die funktionellen Gruppen in den Bereichen 14a und 14b zu exponieren, die Bereiche sind, die im vorstehend beschriebenen Maskierungsschritt geschützt worden waren. Als eine Alternative zur erneuten Positionierung der ersten Maske wird in vielen Ausführungsformen eine zweite Maske verwendet. In anderen alternativen Ausführungsformen können einige Schritte zur Bestrahlung eines gemeinsamen Bereichs in aufeinander folgenden Schritten durchgeführt werden. Wie in Fig. 3 dargestellt, kann es wünschenswert sein, daß die bestrahlten Bereiche getrennt sind. Eine Trennung von etwa 1 bis 5 μm kann beispielsweise geeignet sein, um den Ausrichtungsabweichungen Rechnung zu tragen.

Wie in Fig. 4 dargestellt, wird das Substrat anschließend einem zweiten geschützten Monomer "B" ausgesetzt, wobei die B-Bereiche 16a und 16b produziert werden. Das Substrat wird anschließend erneut maskiert, um die Schutzgruppen zu entfernen und die reaktiven Gruppen auf dem A-Bereich 12a und dem B-Bereich 16b zu exponieren. Das Substrat wird anschließend erneut gegen das Monomer B exponiert, wobei die in Fig. 6 dargestellte Struktur gebildet wird. Die Dimere B-A und B-B wurden auf dem Substrat gebildet.

Eine anschließende Reihe von Maskierungs- und Kontaktschritten, die den vorstehend mit A (nicht dargestellt) beschriebenen gleichen, liefert die in Fig. 7 dargestellte Struktur. Das Verfahren liefert alle möglichen Dimere von B und A, d. h., B-A, A-B, A-A und B-B.

Das Substrat, der Bereich der Synthese und der Bereich zur Synthese jedes einzelnen Polymers kann jede Größe oder Form aufweisen. Es können beispielsweise Vierecke, Ellipsoide, Rechtecke, Dreiecke, Kreise oder Teile davon, sowie unregelmäßige geometrische Formen verwendet werden. Doppelte Synthesebereiche als Redundanz können ebenfalls auf einem einzelnen Substrat verwendet werden.

In einer Ausführungsform weisen die Bereiche 12 und 16 auf dem Substrat eine Oberfläche von etwa 1 cm^2 bis 10^{-10}

cm² auf. In mehreren Ausführungsformen weisen die Bereiche 12 und 16 Flächen von weniger als etwa 10⁻¹ cm², 10⁻² cm², 10⁻³ cm², 10⁻⁴ cm², 10⁻⁵ cm², 10⁻⁶ cm², 10⁻⁷ cm², 10⁻⁸ cm² oder 10⁻¹⁰ cm² auf. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Bereiche 12 und 16 von etwa 10 x 10 µm bis 500 x 500 µm.

In einigen Ausführungsformen trägt ein einziges Substrat mehr als etwa 10 und vorzugsweise mehr als etwa 100 verschiedene Monomersequenzen, obwohl in einigen Ausführungsformen das Substrat mehr als etwa 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ oder 10⁸ verschiedene Sequenzen aufweist. Innerhalb eines Bereichs des Substrats, in dem eine Monomersequenz synthetisiert wird, ist die Monomersequenz selbstverständlich vorzugsweise im wesentlichen rein. In einigen Ausführungsformen enthalten die Bereiche des Substrats Polymersequenzen, die mindestens zu etwa 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % oder 99 % rein sind.

Gemäß einigen Ausführungsformen werden absichtlich mehrere Sequenzen innerhalb eines einzigen Bereichs bereitgestellt, um ein erstes Screening auf eine biologische Aktivität durchzuführen, wonach Materialien innerhalb der eine signifikante Bindung zeigenden Bereiche weiter untersucht werden.

IV. Details einer Ausführungsform eines Reaktionssystems

Fig. 8A erläutert schematisch eine bevorzugte Ausführungsform eines Reaktionssystems 100 zur Synthese von Polymeren auf dem vorbereiteten Substrat gemäß einem erfindungsgemäßen Gesichtspunkt. Das Reaktionssystem schließt einen Körper 102 mit einer Höhlung 104 auf dessen Oberfläche ein. In bevorzugten Ausführungsformen ist die Höhlung 104 zwischen etwa 50 und 1000 µm tief, vorzugsweise weist sie eine Tiefe von 500 µm auf.

Der Boden des Hohlraums weist vorzugsweise eine Reihe von Erhebungen 106 auf, die sowohl in der Ebene als auch

parallel zur Ebene der Figur vorhanden sind. Die Wülste sind vorzugsweise etwa 50 bis 200 μm tief und weisen eine Ausdehnung von etwa 2 bis 3 mm auf. Der Zweck der Wülste besteht darin, zur besseren Vermischung ein turbulentes Fließen zu erzeugen. Die Oberfläche des Bodens des Hohlraums absorbiert vorzugsweise das Licht, um eine Reflexion von einfallendem Licht zu verhindern.

Ein Substrat 112 wird oberhalb der Hohlraum 104 befestigt. Das Substrat wird entlang der Oberfläche des Bodens 114 mit einer durch Bestrahlung entfernbaren Schutzgruppe, beispielsweise NVOC mit oder ohne ein störendes Linkermolekül, bereitgestellt. Das Substrat ist vorzugsweise für ein weites Spektrum des Lichts transparent, in einigen Ausführungsformen jedoch lediglich für die Wellenlänge, mit der die Schutzgruppe entfernt werden kann (beispielsweise für UV-Licht bei NVOC). Das Substrat ist in einigen Ausführungsformen ein üblicher Objektträger aus Glas oder eine Abdeckplatte eines Mikroskops. Das Substrat ist vorzugsweise so dünn wie möglich, während es trotzdem einen geeigneten physikalischen Halt aufweist. Das Substrat ist vorzugsweise weniger als etwa 1 mm dick, stärker bevorzugt weniger als 0,5 mm dick, noch stärker bevorzugt weniger als 0,1 mm dick, und am stärksten bevorzugt weniger als 0,05 mm dick. In alternativen bevorzugten Ausführungsformen ist das Substrat Quarz oder Silizium.

Das Substrat und das Gehäuse dienen dazu, den Hohlraum ausgenommen einer Einlaßöffnung 108 und einer Auslaßöffnung 110 zu verschließen. Das Gehäuse und das Substrat können in einigen Ausführungsformen zur Versiegelung mit einer oder mehreren Dichtungen verbunden werden. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform weist das Gehäuse zwei konzentrische Dichtungen auf, und an den dazwischen liegenden Raum wird ein Vakuum angelegt, um eine sichere Verbindung zwischen dem Substrat und den Dichtungen herzustellen.

Eine Flüssigkeit wird mittels einer Pumpe 116, die beispielsweise ein von Eldex Laboratories hergestelltes Model Nr. B-120-S sein kann, durch die Einlaßöffnung in den

Hohlraum gepumpt. Ausgewählte Flüssigkeiten werden mittels der Pumpe in den Hohlraum, durch den Hohlraum und aus der Auslaßöffnung zur erneuten Zirkulierung oder Entnahme gepumpt. Der Reaktor kann mit Ultraschall behandelt und/oder erhitzt werden, um in einigen Ausführungsformen das Rühren zu unterstützen.

Oberhalb des Substrats 112 befindet sich eine Linse 120, die beispielsweise eine 2" (5,1 cm)-Quarzglaslinse (Eilen) mit einer Brennweite von 100 mm sein kann. Zum Erhalt eines kompakten Systems kann ein reflektierender Spiegel 122 vorhanden sein, um das Licht aus einer Lichtquelle 124 auf das Substrat zu richten. Die Lichtquelle 124 kann beispielsweise eine Xe(Hg)-Lichtquelle (Oriol) sein und die Modellnr. 66024 aufweisen. Eine zweite Linse 126 kann zum Zweck der Projektion eines Maskenbildes auf das Substrat in Kombination mit Linse 120 verwendet werden. Diese Form von Lithographie wird hier als Projektionsdruck bezeichnet. Wie es dieser Beschreibung zu entnehmen ist, kann gemäß einigen Ausführungsformen auch ein Proximitätsdruck etc. verwendet werden.

Das Licht aus der Lichtquelle kann aufgrund der Maske 128 nur ausgewählte Bereiche auf dem Substrat erreichen. Die Maske 128 kann beispielsweise ein Objektträger aus Glas sein, der eingetätztes Chrom aufweist. Die Maske 128 weist in einigen Ausführungsformen ein Gitter aus transparenten und undurchsichtigen Bereichen auf. Derartige Masken können beispielsweise von Photo Sciences, Inc., hergestellt werden. Das Licht fällt unbehindert durch die transparenten Bereiche der Maske, wird jedoch von anderen Bereichen reflektiert oder absorbiert. Daher werden nur ausgewählte Bereiche des Substrats bestrahlt.

Wie vorstehend beschrieben, können Lichtventile (LCDs) als Alternative zu üblichen Masken verwendet werden, um Bereiche des Substrats selektiv zu exponieren. In einer anderen Ausführungsform können Planscheiben aus optischen Fasern, beispielsweise die von Schott Glass, Inc., erhältlichen, verwendet werden, um den Kontrast der Maske zu

verbessern oder als einziges Mittel, den mit Licht bestrahlten Bereich einzugrenzen. Derartige Planscheiben werden direkt oberhalb oder auf das Substrat im in Fig. 8A dargestellten Reaktor angebracht. In noch einer weiteren Ausführungsform können zur Verbesserung des Kontrastes Fliegenaugenlinsen, spitz zulaufende Planscheiben aus optischen Fasern oder ähnlichem verwendet werden.

Zur Bestrahlung von Bereichen, die kleiner als eine Wellenlänge des Lichts sind, können kompliziertere Verfahren verwendet werden. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird das Licht beispielsweise mittels molekularen Mikrokristallen auf der Spitze beispielsweise von Mikropipetten auf das Substrat gerichtet. Derartige Vorrichtungen werden von Lieberman et al., in "A Light Source Smaller Than the Optical Wavelength", Science 247 (1990), 59-61, das hier durch Bezugnahme für alle Zwecke mit eingeschlossen ist, beschrieben.

Beim Betrieb wird das Substrat auf dem Hohlraum angebracht und der Hohlraum versiegelt. Sämtliche Arbeitsschritte im Verfahren zur Herstellung des Substrats werden in einem Raum durchgeführt, der primär oder vollständig durch Licht einer Wellenlänge außerhalb des Lichtbereichs, bei der die Schutzgruppe entfernt wird, erleuchtet ist. Bei NVOC sollte der Raum beispielsweise mit einem üblichen Dunkelkammerlicht, das wenig oder kein UV-Licht liefert, erleuchtet werden. Sämtliche Arbeitsschritte werden vorzugsweise bei etwa Raumtemperatur durchgeführt.

Eine erste Flüssigkeit zur Entfernung der Schutzgruppen (ohne Monomer) wird durch den Hohlraum geleitet. Die Lösung ist vorzugsweise eine 5 mM Schwefelsäure in einer Dioxanlösung, damit die exponierten Aminogruppen protoniert bleiben und ihre Reaktivität mit Nebenprodukten der Photolyse herabgesetzt wird. Absorbierende Materialien, wie N,N-Diethylamino-2,4-dinitrobenzol, können beispielsweise in die Flüssigkeit zur Entfernung der Schutzgruppen, eingeschlossen werden, damit Licht absorbiert und eine Reflektion und eine unerwünschte Photolyse verhindert werden.

Der Objektträger wird anschließend in einem Lichtkanal der Maske positioniert, damit erste Bereiche auf dem Substrat belichtet und dadurch die Schutzgruppen entfernt werden. In bevorzugten Ausführungsformen wird das Substrat zwischen etwa 1 und 15 Minuten, vorzugsweise etwa 10 Minuten, bei 10 bis 20 mW/cm² mit Licht von 365 nm bestrahlt. Die Objektträger werden nach der Photolyse mit beispielsweise einer Lösung von Diisopropylethylamin (DIEA) in Methylenchlorid etwa 5 Minuten neutralisiert (d. h., auf einen pH-Wert von etwa 7 gebracht).

Das erste Monomer wird anschließend an den ersten Stellen auf dem Substrat hinzugefügt. Nach der Bestrahlung wird der Objektträger entfernt, als ganzes behandelt und anschließend in der Durchflußzelle erneut installiert. In einer anderen Ausführungsform wird eine Flüssigkeit, die das vorzugsweise ebenfalls mit einer Schutzgruppe geschützte erste Monomer enthält, mittels der Pumpe 116 durch den Hohlraum gespült. Wenn es beispielsweise gewünscht wird, die Aminosäure Y an ersten Stellen an das Substrat zu binden, wird die Aminosäure Y (die am α -Stickstoff eine Schutzgruppe trägt) zusammen mit Reagenzien, die das Monomer reaktionsbereit machen, und/oder einem Träger aus einem Vorratsbehälter 118 durch die Pumpe, den Hohlraum und zurück zum Einlaß der Pumpe gepumpt.

Die Monomer-Trägerlösung wird in einer bevorzugten Ausführungsform durch Vermischen einer ersten Lösung (hier nachstehend als Lösung "A" bezeichnet) und einer zweiten Lösung (hier nachstehend als "B" bezeichnet) hergestellt. Tabelle 2 stellt ein Gemisch dar, das als Lösung A verwendet werden kann.

Tabelle 2Beispiel einer Monomer-Trägerlösung "A"

100 mg an der Aminogruppe mit NVOC geschützte Aminosäure
 37 mg HOBt (1-Hydroxybenzotriazol)
 250 µl DMF (Dimethylformamid)
 86 µl DIEA (Diisopropylethylamin)

Die Zusammensetzung der Lösung B ist in Tabelle 3 dargestellt. Die Lösungen A und B werden vermischt, etwa 8 Minuten bei Raumtemperatur umgesetzt und anschließend mit 2 ml DMF verdünnt, und 500 µl werden auf die Oberfläche des Objektträgers aufgetragen oder die Lösung durch das Reaktionssystem zirkuliert und etwa 2 Stunden bei Raumtemperatur umgesetzt. Der Objektträger wird anschließend mit DMF, Methylenchlorid und Ethanol gewaschen.

Tabelle 3Beispiel einer Monomer-Trägerlösung "B"

111 mg BOP (Benzotriazolyl-n-oxy-tris-(dimethylamino)
 phosphoniumhexafluorophosphat)

Wenn die Lösung, die das bindende Monomer enthält, durch den Hohlraum zirkuliert, reagieren die Aminosäure oder andere Monomere an ihrem Carboxyterminus mit Aminogruppen auf den Bereichen des Substrats, an denen die Schutzgruppen entfernt worden sind. Obwohl die Erfindung mittels einer Zirkulierung des Monomers durch den Hohlraum erläutert wird, könnte die Erfindung selbstverständlich durch Entfernung des Objektträgers aus dem Reaktor und Eintauchen in eine geeignete Monomerlösung durchgeführt werden.

Nach der Zugabe des ersten Monomers wird die erste Aminosäure enthaltende Lösung aus dem System gespült. Nach der Zirkulierung einer zur sicheren Entfernung der Aminosäure ausreichenden Menge des DMF/Methylenchlorids (z. B. etwa das 50fache Volumen des Hohlraums und der Trägerlinien) wird die Maske oder das Substrat erneut positioniert, oder es wird eine neue Maske verwendet, so daß zweite Bereiche auf dem Substrat bestrahlt werden, und das Licht 124 wird für eine zweite Exponierung verwendet. Dadurch werden die Schutzgruppen auf zweiten Bereichen auf dem Substrat entfernt und das Verfahren bis zur Synthese der gewünschten Polymersequenzen wiederholt.

Das gesamte derivatisierte Substrat wird anschließend gegen einen vorzugsweise beispielsweise mit einem Fluoreszenzmarker markierten, gewünschten Rezeptor exponiert, indem eine Lösung oder Suspension des Rezeptors durch den Hohlraum zirkuliert wird oder indem die Oberfläche des Objektträgers als ganzes damit in Kontakt gebracht wird. Der Rezeptor bindet vorzugsweise an bestimmte Bereiche des Substrats, die komplementäre Sequenzen enthalten.

Die Antikörper werden üblicherweise in einem sogenannten "Supercocktail" suspendiert, der beispielsweise eine Lösung von etwa 1 % BSA (Rinderserumalbumin) und 0,5 % Tween in PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)-Puffer sein kann. Die Antikörper werden im Supercocktail-Puffer zu einer Endkonzentration von beispielsweise etwa 0,1 bis 4 µg/ml verdünnt.

Fig. 8B stellt eine alternative bevorzugte Ausführungsform des in Fig. 8A dargestellten Reaktors dar. Gemäß dieser Ausführungsform wird die Maske 128 direkt mit dem Substrat in Kontakt gebracht. Der geätzte Teil der Maske wird vorzugsweise mit der Vorderseite nach unten angebracht, so daß die Wirkungen der Lichtdispersion reduziert werden. In dieser Ausführungsform sind die Bildlinsen 120 und 126 nicht erforderlich, da die Maske in unmittelbare Nähe zum Substrat gebracht wird.

Zur Verbesserung des Signal-Echo-Verhältnisses des

Verfahrens wird in einigen erfindungsgemäßen Ausführungsformen das Substrat einem ersten markierten oder nicht-markierten Rezeptor ausgesetzt, wonach es gegen einen zweiten markierten Rezeptor (z. B. ein Antikörper), der an mehrere Stellen auf dem ersten Rezeptor bindet, exponiert wird. Wenn der erste Rezeptor beispielsweise ein Antikörper ist, der von einer ersten Tierart stammt, ist der zweite Rezeptor ein Antikörper, der von einer zweiten Art stammt und gegen Epitope gerichtet ist, die mit der ersten Art verbunden sind. Bei einem Mausantikörper kann beispielsweise ein Fluoreszenz-markierter Ziegenantikörper oder ein anti-Maus-Antiserum zur Bindung an mehrere Stellen auf dem Mausantikörper verwendet werden, wobei im Vergleich zur Bindung eines einzigen Mausantikörpers an jeder Bindungsstelle ein Mehrfaches der Fluoreszenz erhalten wird. Dieses Verfahren kann mit weiteren Antikörpern (z. B. Ziegen-Maus-Ziegen etc.) zur weiteren Vermehrung der Signale wiederholt werden.

In bevorzugten Ausführungsformen wird eine geordnete Reihenfolge von Masken verwendet. In einigen Ausführungsformen kann lediglich eine einzige Maske zur Synthese von sämtlichen möglichen Polymeren eines bestimmten Satzes von Monomeren verwendet werden.

Wenn beispielsweise alle 16 Dinucleotide aus vier Basen synthetisiert werden sollen, wird ein quadratischer 1 cm² großer Synthesebereich systematisch in 16 jeweils 0,25 cm große Kästchen aufgeteilt. Die vier Monomereinheiten werden als A, B, C und D bezeichnet. Die ersten Umsetzungen werden in vier vertikalen, 0,25 cm großen Spalten durchgeführt. Die erste Maske exponiert die Spalte der Kästchen ganz auf der linken Seite, an die A gekuppelt wird. Die zweite Maske exponiert die nächste Spalte, an die B gekuppelt wird, wonach eine dritte Maske die Spalte, an die C gekuppelt wird, und eine letzte Maske die Spalte ganz auf der rechten Seite, an die D gekuppelt wird, exponiert. Die erste, zweite, dritte und vierte Maske kann eine einzelne Maske sein, die auf unterschiedliche Bereiche verschoben

wird.

Das Verfahren wird in horizontaler Richtung für die zweite Dimereinheit wiederholt. Diesmal ermöglicht die Maske die Exponierung von horizontalen Reihen, die wiederum 0,25 cm groß sind. A, B, C und D werden unter Verwendung von Masken, die die horizontalen vier Kästchen des Reaktionsbereichs exponieren, nacheinander angefügt. Das erhaltene Substrat enthält alle 16 Dinucleotide der vier Basen.

Die acht zur Synthese des Dinucleotids verwendeten Masken sind miteinander durch Verschiebung oder Drehung verbunden. Tatsächlich kann eine Maske in allen acht Schritten verwendet werden, wenn sie in geeigneter Weise gedreht und verschoben wird. Im vorstehend beschriebenen Beispiel kann beispielsweise eine Maske mit einem einzigen transparenten Bereich nacheinander verwendet werden, um jede der vertikalen Spalten zu exponieren, indem sie um 90° gedreht und anschließend nacheinander verwendet wird, damit die horizontalen Reihen exponiert werden können.

Die Tabellen 4 und 5 stellen ein einfaches Computerprogramm in Quick Basic zur Planung eines Maskierungsprogramms bereit bzw. ein berechnetes Produktionsergebnis für die Synthese einer Polymerkette aus drei Monomeren ("Resten") mit drei verschiedenen Monomeren in der ersten Stufe, vier verschiedenen Monomeren in der zweiten Stufe und fünf verschiedenen Monomeren in der dritten Stufe in einem Streifenmuster. Das Ergebnis des Programms ist die Zahl der Zellen, die Zahl von "Streifen" (helle Bereiche) auf jeder Maske und die für jede Exponierung der Maske erforderliche Verschiebung.

Tabelle 4Masken-Strategieprogramm

```

DEFINT A-Z
DIM b(20), w(20), l(500)
FS = "LPT1:"
OPEN FS FOR OUTPUT AS #1

jmax = 3          'Number of residues (Zahl der Reste)
b(1) = 3: b(2) = 4: b(3) = 5    'Number of building blocks for res 1.2.3
g = 1: lmax(1) = 1              (Zahl der Herstellungsblocks für Reste 1.2.3)

FOR j = 1 TO jmax: g = g * b(j): NEXT j

w(0) = 0: w(1) = g / b(1)

PRINT #1, "MASK2.BAS ", DATE$, TIME$: PRINT #1,
PRINT #1, USING "Number of residues=="; jmax    (Zahl der Reste)
FOR j = 1 TO jmax
PRINT #1, USING "      Residue ==      == building blocks": j, b(j)
NEXT j
PRINT #1, "
PRINT #1, USING "Number of cells=====": g: PRINT #1,
      (Zahl der Zellen)

FOR j = 2 TO jmax
lmax(j) = lmax(j - 1) * b(j - 1)
w(j) = w(j - 1) / b(j)
NEXT j

FOR j = 1 TO jmax
PRINT #1, USING "Mask for residue ==": j: PRINT #1, (Maske für Rest)
PRINT #1, USING "      Number of stripes=="; lmax(j) (Zahl der Reihen)
PRINT #1, USING "      Width of each stripe=="; w(j) (Breite jeder Reihe)
FOR l = 1 TO lmax(j)
a = 1 + (l - 1) * w(j - 1)
ae = a + w(j) - 1
PRINT #1, USING "      Stripe == begins at location == and ends at ==": l, a, ae
NEXT l
PRINT #1,
PRINT #1, USING "      For each of == building blocks, translate mask by ==
cell(s)": b(j); w(j), (für jeden) (Herstellungsblock verschiebe Maske um)
PRINT #1, : PRINT #1, : PRINT #1,
NEXT j

```

Tabelle 5Ergebnis der Maskenstrategie

Zahl der Reste - 3

Rest 1 3 Herstellungsblocks
 Rest 2 4 Herstellungsblocks
 Rest 3 5 Herstellungsblocks

Zahl der Zellen - 60

Maske für Rest 1

Zahl der Reihen - 1
 Größe jeder Reihe - 20
 Reihe 1 beginnt am Bereich und t am Bereich 20

Bei jedem der 3 Herstellungsblocks
 verschiebe die Maske um 20 Zellen

Maske für Rest 2

Zahl der Reihen - 3
 Größe jeder Reihe - 5
 Reihe 1 beginnt am Bereich 1 und ende a Bereich 5
 Reihe 2 beginnt am Bereich 21 und ende i Bereich 25
 Reihe 3 beginnt am Bereich 41 und ende: r Bereich 45

Bei jedem der 4 Herstellungsblocks
 verschiebe die Maske um 5 Zellen

Maske für Rest 3

Zahl der Reihen - 12
 Größe jeder Reihe - 1

Reihe 1 beginnt am Bereich 1 und endet am Bereich 1
 Reihe 2 beginnt am Bereich 6 und endet am Bereich 6
 Reihe 3 beginnt am Bereich 11 und endet am Bereich 11
 Reihe 4 beginnt am Bereich 16 und endet am Bereich 16
 Reihe 5 beginnt am Bereich 21 und endet am Bereich 21
 Reihe 6 beginnt am Bereich 26 und endet am Bereich 26
 Reihe 7 beginnt am Bereich 31 und endet am Bereich 31
 Reihe 8 beginnt am Bereich 36 und endet am Bereich 36
 Reihe 9 beginnt am Bereich 41 und endet am Bereich 41
 Reihe 10 beginnt am Bereich 46 und endet am Bereich 46
 Reihe 11 beginnt am Bereich 51 und endet am Bereich 51
 Reihe 12 beginnt am Bereich 56 und endet am Bereich 56

Bei jedem der 5 Herstellungsblocks
verschiebe die Maske um 1 Zelle

© Copyright 1990. Affymax N.V.

V. Details einer Ausführungsform einer Vorrichtung zum Fluoreszenznachweis

Fig. 9 stellt eine Fluoreszenz-Meßvorrichtung zum Nachweis von Fluoreszenz-markierten Rezeptoren auf einem Substrat dar. Ein Substrat 112 wird auf einen x/y-Positioniertisch 202 angebracht. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der x/y-Positioniertisch ein Modell mit der Nr. PM500-A1 (Newport Corporation). Ein geeignet programmierter digitaler Computer 204, der beispielsweise ein geeignet programmierter IBM PC/AT oder AT kompatibler Computer sein kann, ist an den x/y-Positioniertisch angeschlossen und steuert ihn. Andere Computersysteme, speziell entwickelte Hardware oder ähnliches können den hier zur Erläuterung verwendeten AT-Computer leicht ersetzen. Computersoftware für die hier beschriebenen Bewegungs- und die Datenspeicherungsfunktionen kann ausgehend von im Handel erhältlicher Software, die hier für alle Zwecke durch Bezugnahme eingeschlossen ist, einschließlich beispielsweise dem Programm "Lab Windows", die von den National Instruments

lizensiert wird, bereitgestellt werden.

Das Substrat und der x/y-Positioniertisch werden unter einem Mikroskop 206 angeordnet, das ein oder mehrere Objektive 208 einschließt. Licht (etwa 488 nm) von einem Laser 210, der in einigen Ausführungsformen ein Modell Nr. 2020-05 eines Argon-Ionenlasers (Spectraphysics) ist, wird durch einen dichroitischen Spiegel 207, der Licht von mehr als etwa 520 nm durchläßt, Licht von 488 nm jedoch reflektiert, auf das Substrat gerichtet. Der dichroitische Spiegel 207 kann beispielsweise ein Modell Nr. FT510 (Carl Zeiss) sein. Das vom Spiegel reflektierte Licht fällt anschließend in das Mikroskop 206, das beispielsweise ein Modell Nr. Axioscop 20 (Carl Zeiss) sein kann. Fluorescein-markierte Materialien auf dem Substrat fluoreszieren bei Licht von mehr als 488 nm, und das fluoreszierende Licht wird durch ein Mikroskop gesammelt und durch den Spiegel geleitet. Das fluoreszierende Licht des Substrats wird anschließend durch ein Wellenlängenfilter 209 geleitet und anschließend durch eine Lochplatte 211 gelenkt. Das Wellenlängenfilter 209 kann beispielsweise ein Modell Nr. OG530 (Melles Griot) und die Lochscheibe 211 ein Modell Nr. 477352/477380 (Carl Zeiss) sein.

Das fluoreszierende Licht fällt anschließend in eine Photoelektronenvervielfacherröhre 212, die in einigen Ausführungsformen ein Modell Nr. R943-02 (Hamamatsu) ist, das Signal wird im Vorverstärker 214 verstärkt und die Photonen durch einen Photonen-zähler 216 gezählt. Die Photonen-zahl wird als Funktion des Bereichs im Computer 204 aufgezeichnet. Vorverst. 214 ist beispielsweise ein Modell Nr. SR440 (Stanford Research Systems) und der Photonen-zähler 216 ein Modell Nr. SR400 (Stanford Research Systems). Das Substrat wird anschließend zu einem anderen Bereich geschoben und das Verfahren wiederholt. In bevorzugten Ausführungsformen werden die Daten alle 1 bis 100 μm gesammelt, wobei ein Datensammlungsdurchmesser von etwa 0,8 bis 10 μm bevorzugt ist. In Ausführungsformen mit ausreichend hoher Fluoreszenz wird ein CCD-Detektor mit Breitfelderleuchtung

verwendet.

Durch Zählen der Photonenzahl, die in einem bestimmten Bereich als Antwort auf den Laser erzeugt wird, kann festgestellt werden, wo sich Fluoreszenz-markierte Moleküle auf dem Substrat befinden. Bei einem Objektträger, der beispielsweise eine Matrix von synthetisierten Polypeptiden auf der Oberfläche aufweist, kann festgestellt werden, welches der Polypeptide zu einem Fluoreszenz-markierten Rezeptor komplementär ist.

Gemäß bevorzugten Ausführungsformen wird die Intensität und Dauer des Lichts, mit dem das Substrat bestrahlt wird, durch Veränderung des Laserstroms und der Stufe der Abtastgeschwindigkeit kontrolliert, um das Signal-Echo-Verhältnis durch Maximierung der Fluoreszenzemission und Minimierung des Hintergrundgeräusches zu verbessern.

Während die Nachweisvorrichtung hier primär im Hinblick auf markierte Rezeptoren erläutert worden ist, kann die Erfindung auch in anderen Bereichen verwendet werden. Die hier beschriebene Nachweisvorrichtung kann beispielsweise in den Bereichen der Katalyse, dem DNA- oder Protein-Gel-Scanning und ähnlichem verwendet werden.

VI. Bestimmung der relativen Bindungsstärke von Rezeptoren

Das erfindungsgemäße Signal-Echo-Verhältnis ist ausreichend hoch, so daß nicht nur die Gegenwart oder Abwesenheit eines Rezeptors auf einem Liganden nachgewiesen werden kann, sondern auch die relative Bindungsaffinität der Rezeptoren gegen eine Vielzahl von Sequenzen bestimmt werden kann.

In der Praxis wird festgestellt, daß ein Rezeptor mehrere Peptidsequenzen in einer Anordnung bindet, einige Sequenzen jedoch viel stärker bindet als andere. Eine starke Bindungsaffinität wird hier durch ein stark fluoreszierendes oder radiographisches Signal nachgewiesen, da viele Rezeptormoleküle in einem Bereich eines stark gebundenen Liganden binden. Umgekehrt wird eine schwache Bindungsaffinität durch

ein fluoreszierendes oder radiographisches Signal nachgewiesen, das aufgrund der relativ kleinen Zahl von Rezeptormolekülen, die in einem bestimmten Bereich eines Substrats binden, das einen Liganden mit einer schwachen Bindungsaffinität für den Rezeptor aufweist, schwach ist. Daher wird es möglich, die relative Bindungsavidität (oder Affinität bei monovalenten Interaktionen) eines hier beschriebenen Liganden mittels der Intensität eines fluoreszierenden oder radiographischen Signals in einem diesen Liganden enthaltenden Bereich zu bestimmen.

Halbquantitative Daten über die Affinitäten können auch erhalten werden, indem die Waschbedingungen und Rezeptorkonzentrationen verändert werden. Dies kann beispielsweise durch einen Vergleich mit bekannten Ligand-Rezeptor-Paaren durchgeführt werden.

VII. Beispiele

Die nachstehend beschriebenen Beispiele sollen die Wirksamkeit der hier beschriebenen Erfindung erläutern. Sämtliche Arbeitsschritte wurden bei etwa Umgebungstemperaturen und -drücken durchgeführt, sofern nicht das Gegenteil angegeben ist.

A. Objektträgerherstellung

Vor dem Anfügen der reaktiven Gruppen wird das Substrat, das in einer bevorzugten Ausführungsform ein Glassubstrat ist, beispielsweise ein Objektträger eines Mikroskops oder einer Abdeckplatte, vorzugsweise gereinigt. Gemäß einer Ausführungsform wird der Objektträger 12 Stunden in ein Alkalibad, das beispielsweise aus 1 Liter 95 % Ethanol mit 120 ml Wasser und 120 Gramm Natriumhydroxid besteht, getaucht. Die Objektträger werden anschließend unter fließendem Wasser gewaschen, an der Luft getrocknet und einmal mit einer Lösung aus 95 % Ethanol gespült.

Die Objektträger werden anschließend beispielsweise

mit Aminopropyltriethoxysilan aminierte, um Aminogruppen an die Glasoberfläche auf den Linkermolekülen anzuknüpfen, obwohl jedes omega-funktionalisierte Silan für diesen Zweck ebenfalls verwendet werden kann. In einer Ausführungsform werden 0,1 % Aminopropyltriethoxysilan verwendet, obwohl Lösungen mit Konzentrationen von 10^{-7} % bis 10 %, vorzugsweise von etwa 10^{-3} % bis 2 %, verwendet werden können. Ein 0,1 % Gemisch wird durch Zugabe von 100 ml eines 95 % Ethanol/5 % Wasser-Gemisches zu 100 Microlitern (μ l) Aminopropyltriethoxysilan hergestellt. Das Gemisch wird bei etwa Umgebungstemperatur auf einem Rundschüttler etwa 5 Minuten geschüttelt. 500 μ l dieses Gemisches werden anschließend auf die Oberfläche einer Seite jedes gereinigten Objektträgers gegeben. Nach 4 Minuten wird diese Lösung auf den Objektträgern dekantiert und dreimal beispielsweise durch Eintauchen in 100 % Ethanol gespült.

Nach der Trocknung werden die Platten etwa 20 Minuten bei 110 bis 120°C in einen Vakuumofen gegeben und anschließend etwa 12 Stunden bei Raumtemperatur in einer Argonatmosphäre getrocknet. Die Objektträger werden anschließend in eine DMF (Dimethylformamid)-Lösung getaucht, wonach sie sorgfältig mit Methylenchlorid gewaschen werden.

Die aminierte Oberfläche des Objektträgers wird anschließend beispielsweise gegen etwa 500 μ l einer 30 millimolaren (mM) Lösung aus NVOC-GABA (gamma-Aminobuttersäure) und NHS (N-Hydroxysuccinimid) in DMF zur Bindung von NVOC-GABA an jede der Aminogruppen exponiert.

Die Oberfläche wird beispielsweise mit DMF, Methylenchlorid und Ethanol gewaschen.

Nicht umgesetztes Aminopropylsilan an der Oberfläche - das heißt, die Aminogruppen, an die kein NVOC-GABA geknüpft wurde - wird nun durch eine einstündige Exponierung gegen ein 1:3-Gemisch aus Essigsäureanhydrid in Pyridin an den Enden mit Acetylgruppen versehen (zur Verhinderung einer weiteren Reaktion). Beispiele für weitere Materialien, die diese Capping-Funktion des Restes erfüllen, sind Trifluoressigsäureanhydrid, Ameisensäureacetanhydrid oder andere

reaktive Acylierungsmittel. Die Objektträger werden schließlich erneut mit DMF, Methylenchlorid und Ethanol gewaschen.

B. Synthese von acht Trimeren aus "A" und "B"

Fig. 10 stellt eine mögliche Synthese der acht Trimeren aus einem Satz von zwei Monomeren dar: Gly und Phe (durch "A" bzw. "B" dargestellt). Ein Objektträger aus Glas, der Silangruppen, die in 6-Nitroveratryloxycarboxamid (NVOC-NH)-Resten enden, trägt, wird als Substrat hergestellt. Die aktiven Ester (Pentafluorphenyl, OBt, etc.) von Gly und Phe, die an der Aminogruppe durch NVOC geschützt sind, werden als Reagenzien hergestellt. Wenn Schutzgruppen für Seitenketten für den Satz von Monomeren erforderlich sind, obwohl es für dieses Beispiel nicht relevant ist, dürfen diese nicht bei der Wellenlänge des Lichts photoreaktiv sein, das zur Entfernung der Schutzgruppen der primären Kette verwendet wird.

Für einen Satz Monomere der Größe n sind $n \times l$ Zyklen zur Synthese aller möglichen Sequenzen der Länge l erforderlich. Ein Zyklus besteht aus:

1. Bestrahlung durch eine geeignete Maske, um die Aminogruppen an den Stellen zu exponieren, an denen der nächste Rest angefügt werden soll, wobei in geeigneter Weise gewaschen wird, um die Nebenbestandteile der Abspaltung der Schutzgruppe zu entfernen.
2. Zugabe eines einzelnen aktivierten und (mit der gleichen photochemisch entfernbaren Gruppe) geschützten Monomers, das lediglich mit den in Schritt 1 angesprochenen Stellen reagiert, wobei in geeigneter Weise gewaschen wird, um den Überschuss an Reagenz von der Oberfläche zu entfernen.

Der vorstehend beschriebene Zyklus wird für jeden Bestandteil des Satzes von Monomeren wiederholt, bis jede Stelle auf der Oberfläche in einer Ausführungsform um einen Rest erweitert worden ist. In anderen Ausführungsformen werden vor dem Übergang zur nächsten Stelle mehrere Reste

nacheinander an eine Stelle angefügt. Zykluszeiten werden üblicherweise durch die Rate der Kupplungsreaktion beschränkt, die in einem automatischen Peptidsynthesizer 20 Min. ist. Diesem Schritt schließt sich gegebenenfalls die Zugabe einer Schutzgruppe an, um die Anordnung für einen späteren Test zu stabilisieren. Für einige Arten von Polymeren (z. B. Peptide) kann eine letztendlich durchgeführte Entfernung der Schutzgruppe der gesamten Oberfläche (Entfernung von photoreaktiven Gruppen der Seitenketten) erforderlich sein.

Wie in Fig. 10A dargestellt, weist insbesondere das Glas 20 die Bereiche 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 und 36 auf. Die Bereiche 30, 32, 34 und 36 sind maskiert, wie in Fig. 10B dargestellt, und das Glas wird bestrahlt und gegen ein Reagenz exponiert, das "A" (z. B. Gly) enthält, wobei die in Fig. 10C dargestellte Struktur erhalten wird. Anschließend werden die Bereiche 22, 24, 26 und 28 maskiert, das Glas (wie in Fig. 10D dargestellt) bestrahlt und einem Reagenz exponiert, das "B" (z. B. Phe) enthält, wobei die in Fig. 10E dargestellte Struktur erhalten wird. Das Verfahren wird durchgeführt, indem die Bereiche, wie dargestellt, nacheinander maskiert und exponiert werden, bis die in Fig. 10M dargestellte Struktur erhalten wird. Das Glas wird bestrahlt und die terminalen Gruppen gegebenenfalls durch Acetylierung mit Enden versehen. Wie dargestellt, werden sämtliche möglichen Trimere von Gly/Phe erhalten.

In diesem Beispiel ist keine Entfernung der Schutzgruppe der Seitenkette erforderlich. Falls erwünscht, kann durch eine Behandlung mit Ethandithiol und Trifluoressigsäure die Entfernung der Schutzgruppen der Seitenketten durchgeführt werden.

Üblicherweise ist die Zahl der zum Erhalt einer bestimmten Polymerkette erforderlichen Schritte definiert durch:

$$n \times 1 \quad (1)$$

in der

n = die Zahl der Monomeren im Basissatz von Monomeren
und

l = die Zahl der Monomereinheiten in einer
Polymerkette ist.

Umgekehrt ist die synthetisierte Zahl von Sequenzen
der Länge l :

$$n^l. \quad (2)$$

Selbstverständlich wird durch Verwendung von Maskierungsstrategien, die auch die Synthese von Polymeren mit einer Länge von weniger als l einschließen, eine größere Diversität erhalten. Wenn im extremen Fall sämtliche Polymere mit einer Länge von weniger als oder gleich l synthetisiert werden, ist die Zahl der synthetisierten Polymere:

$$n^l + n^{l-1} + \dots + n^1. \quad (3)$$

Die Höchstzahl von erforderlichen lithographischen Schritten ist üblicherweise n für jede "Schicht" von Monomeren, d. h., die Gesamtzahl von erforderlichen Masken (und daher die Zahl von lithographischen Schritten) ist $n \times l$. Die Größe der transparenten Maskenbereiche ändert sich gemäß dem zur Synthese verfügbaren Bereich des Substrats und der Zahl der gebildeten Sequenzen. Üblicherweise ist die Größe des Synthesebereichs:

$$\text{Größe der Synthesebereiche} = (A)/(S)$$

in der

A der insgesamt zur Synthese verfügbare Bereich
und

S die Zahl der in dem Bereich gewünschten Sequenzen
ist.

Es ist für den Fachmann selbstverständlich, daß das vorstehend beschriebene Verfahren leicht verwendet werden kann, um gleichzeitig tausende oder millionen Oligomere auf einem Substrat unter Verwendung der hier beschriebenen photolithographischen Verfahren zu produzieren. Daher können mit diesem Verfahren beispielsweise zahlreiche Di-, Tri-, Tetra-, Penta-, Hexa-, Hepta-, Octa-, Dodecapeptide oder größere Polypeptide (oder entsprechend Polynucleotide) praktisch getestet werden..

Das vorstehend beschriebene Beispiel erläutert das Verfahren mittels eines von Hand durchgeführten Beispiels. Es ist natürlich selbstverständlich, daß automatische oder halbautomatische Verfahren verwendet werden können. Das Substrat wird in eine Durchflußzelle zur automatischen Zugabe und Entfernung der Reagenzien gegeben, um das Volumen der erforderlichen Reagenzien zu minimieren und die Reaktionsbedingungen sorgfältiger zu kontrollieren. Darauf folgende Masken können von Hand oder automatisch angebracht werden.

C. Synthese eines Dimers aus einer Aminopropylgruppe und einer fluoreszierenden Gruppe

Zur Synthese des Dimers aus einer Aminopropylgruppe und einer fluoreszierenden Gruppe wurde eine aktivierte Durapore-Membran als Substrat verwendet. Die Durapore-Membran war ein Polyvinylidendifluorid mit Aminopropylgruppen. Die Aminopropylgruppen wurden mit der DDZ-Gruppe geschützt, indem das Carbonylchlorid mit den Aminogruppen umgesetzt wurde, eine Umsetzung, die dem Fachmann vertraut ist. Die diese Gruppen tragende Oberfläche wurde in eine THF-Lösung gegeben und mit einer Maske in Kontakt gebracht, die ein Schachbrettmuster von 1 mm großen undurchsichtigen und transparenten Bereichen aufwies. Die Maske wurde 5 Minuten bei Umgebungstemperatur gegen ultraviolettes Licht exponiert, das eine Wellenlänge bis herunter zu mindestens etwa 280 nm aufwies, obwohl in einigen erfindungsgemäßen

Ausführungsformen zahlreiche Exponierungszeiten und Temperaturen geeignet sein können. In einer Ausführungsform kann beispielsweise eine Exponierungszeit von etwa 1 bis 5 000 Sekunden bei Verfahrenstemperaturen von -70 bis +50°C verwendet werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden bei etwa Umgebungsdruck Exponierungszeiten von etwa 1 bis 500 Sekunden verwendet. In einigen bevorzugten Ausführungsformen wird zur Verhinderung einer Verdampfung ein über dem Umgebungsdruck liegender Druck verwendet.

Die Oberfläche der Membran wurde anschließend etwa 1 Stunde mit einem fluoreszierenden Marker gewaschen, der einen aktiven an ein Chelat eines Lanthaniden gebundenen Ester einschließt. Die Waschzeiten variieren über einen weiten Wertebereich von etwa einigen wenigen Minuten bis einigen Stunden. Diese Materialien fluoreszieren im roten und grünen sichtbaren Bereich. Nach der Umsetzung mit dem aktiven Ester im Fluorophor konnten die Bereiche, an denen der Fluorophor gebunden war, durch Exponierung gegen ultraviolettes Licht und der Beobachtung der roten und grünen Fluoreszenz sichtbar gemacht werden. Es wurde beobachtet, daß die derivatisierten Bereiche des Substrats dem ursprünglichen Muster der Maske sehr ähnlich waren.

D. Nachweis der Fähigkeit zur Aussendung eines Signals

Der Nachweis der Fähigkeit zur Aussendung eines Signals wurde unter Verwendung eines Modells Nr. 824 des Standardkits unter Verwendung von Kügelchen mit geringer Fluoreszenz (Flow Cytometry Standarda) gezeigt. Dieses Kit schließt Kügelchen mit einem Durchmesser von 5,8 μm ein, die jeweils mit einer bekannten Zahl von Fluoresceinkügelchen imprägniert sind.

Ein Kügelchen wurde in den beleuchteten Bereich auf der Scan-Bühne, wie in Fig. 9 dargestellt, in einen Bereich eines Laserspots, der anfänglich ausgeblendet war, gegeben. Nachdem die Photonennachweisvorrichtung im bestrahlten

Bereich positioniert worden war, wurde sie eingestellt. Die Blockierung des Laserstrahls wurde aufgehoben, und er trat mit der Teilchenkugel in Wechselwirkung, die dann fluoreszierte. Diagramme der Fluoreszenz von Kügelchen, die mit 7 000 bzw. 29 000 Fluoresceinmolekülen imprägniert waren, sind in den Figuren 11A bzw. 11B dargestellt. In jedem Diagramm sind auch Spuren von Kügelchen ohne Fluoresceinmoleküle dargestellt. In diesen Experimenten wurde mit 488 nm angeregt und 100 μ W Laserstrom verwendet. Das Licht wurde durch ein 0,75 NA-Objektiv mit einer Vergrößerungskraft von 40 fokussiert.

Die Intensität der Fluoreszenz begann in allen Fällen an einem hohen Wert und verringerte sich anschließend exponentiell. Der Abfall der Intensität wird durch ein durch Licht verursachtes Ausbleichen der Fluoresceinmoleküle verursacht. Die Spuren der Kügelchen ohne Fluoresceinmoleküle werden zum Abzug des Hintergrunds verwendet. Die Differenz des anfänglichen exponentiellen Abfalls zwischen markierten und nicht-markierten Kügelchen wird integriert, um die Gesamtzahl der Photonenzerfälle zu erhalten, und diese Zahl wird mit der Zahl von Molekülen pro Kügelchen in Beziehung gesetzt. Es ist daher möglich, die Zahl der Photonen pro nachweisbarem Fluoresceinmolekül abzuleiten. Für die Diagramme in Fig. 11 zeigt diese Berechnung, daß eine Strahlung von etwa 40 bis 50 Photonen pro Fluoresceinmolekül nachgewiesen wird.

E. Bestimmung der Zahl von Molekülen pro Einheitsbereich

Gemäß den vorstehend beschriebenen Verfahren hergestellte aminopropylierte Glas-Objektträger eines Mikroskops wurden verwendet, um die Dichte der Markierung der Objektträger zu etablieren. Die freien Aminotermini der Objektträger wurden mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat), das die Aminogruppe kovalent bindet, umgesetzt. Der Objektträger wird anschließend gescanned, um die Zahl der in einem Bereich erzeugten fluoreszierenden Photonen zu zählen, wo-

durch unter Verwendung der geschätzten 40 bis 50 Photonen pro Fluoresceinmolekül die Zahl der Moleküle berechnet werden kann, die auf der Oberfläche pro Einheitsbereich vorhanden sind.

Ein Objektträger mit Aminopropylsilan auf seiner Oberfläche wurde in eine 1 mM Lösung von FITC in DMF 1 Stunde bei etwa Umgebungstemperatur getaucht. Nach der Umsetzung wurde der Objektträger zweimal mit DMF und anschließend mit Ethanol und Wasser und anschließend erneut mit Ethanol gewaschen. Er wurde anschließend getrocknet und dunkel aufbewahrt, bis er untersucht werden konnte.

Durch die Verwendung von Diagrammen, die den in Fig. 11 dargestellten ähnlich sind, und durch Integration der Fluoreszenz-Zählereignisse unter dem exponentiell abnehmenden Signal wurde nach der Derivatisierung die Zahl der freien Aminogruppen auf der Oberfläche ermittelt. Es wurde festgestellt, daß Objektträger mit Markierungsdichten von 1 Fluorescein pro $10^3 \times 10^3$ bis $\sim 2 \times 2$ nm reproduzierbar hergestellt werden können, wobei die Konzentration von Aminopropyltriethoxysilan zwischen $10^{-5} \%$ bis $10^{-1} \%$ variierte.

F. Entfernen von NVOC und Anknüpfen eines fluoreszierenden Markers

NVOC-GABA-Gruppen wurden, wie vorstehend beschrieben, angefügt. Die gesamte Oberfläche auf einem Objektträger wurde bestrahlt, um eine freie Aminogruppe am Ende der gamma-Aminobuttersäure zu exponieren. Dieser Objektträger und ein nicht exponiertes Duplikat wurden anschließend gegen das Fluoresceinisothiocyanat (FITC) exponiert.

Fig. 12A zeigt den Objektträger, der nicht bestrahlt wurde, der jedoch gegen das FITC exponiert war. Die Einheiten der x-Achse sind die Zeit, und die Einheiten der y-Achse sind die Zählereignisse. Die Spur enthält eine bestimmte Menge der Hintergrund-Fluoreszenz. Das Duplikat des Objektträgers wurde etwa 1 Minute gegen 350 nm breitbandige

Bestrahlung (12 mW/cm^2 , $\sim 350 \text{ nm}$ Bestrahlung) exponiert, gewaschen und mit FITC umgesetzt. Die Fluoreszenz-Diagramme dieses Objektträgers sind in Fig. 12B dargestellt. Eine starke Erhöhung der Fluoreszenz wird beobachtet, was anzeigt, daß die Photolyse mehrere Aminogruppen auf der Oberfläche der Objektträger zur Anknüpfung eines Fluoreszenz-markers exponiert hat.

G. Verwendung einer Maske zur Entfernung von NVOC

Das nächste Experiment wurde mit einem mit 0,1 % Aminopropylgruppen versehenen Objektträger durchgeführt. Licht von einer Hg-Xe-Bogenlampe wurde durch eine Laser-verdampfte Chrom-auf-Glas-Maske, die in direktem Kontakt mit dem Substrat ist, projiziert.

Der Objektträger wurde etwa 5 Minuten mit 12 mW 350 nm breitbandigem Licht bestrahlt und anschließend mit der 1 mM FITC-Lösung umgesetzt. Er wurde auf die Abtastbühne für den Lasernachweis gelegt und ein Diagramm als eine zweidimensionale Wiedergabe der Intensität der Fluoreszenz gezeichnet. Das Experiment wurde durch verschiedene Masken mehrfach wiederholt. Die Fluoreszenzmuster einer $100 \times 100 \mu\text{m}$, $50 \mu\text{m}$, $20 \mu\text{m}$ und $10 \mu\text{m}$ Maske zeigen, daß das Maskenmuster unter Verwendung dieser lithographischen Verfahren bis herab zu mindestens etwa $10 \mu\text{m}$ -Vierecke deutlich ist.

H. Anknüpfen von YGGFL und anschließendes Exponieren gegen Herz-Antikörper und Ziegen-anti-Maus-Antikörper

Um sicherzustellen, daß Rezeptoren gegen eine bestimmte Polypeptidsequenz ein an eine Oberfläche gebundenes Peptid binden und nachgewiesen werden können, wurde Leu-Enkephalin an die Oberfläche gebunden und durch einen Antikörper erkannt. Ein Objektträger wurde mit 0,1 % Aminopropyltriethoxysilan derivatisiert und mit NVOC geschützt. Eine $500 \mu\text{m}$ Damebrettmaske wurde verwendet, um den

Objektträger unter Verwendung von rückseitigem Kontaktdruck in einer Durchflußzelle zu exponieren. Die Leu-Enkephalinsequenz (H_2N -Tyrosin, Glycin, Glycin, Phenylalanin, Leucin- CO_2H , (hier nachstehend als YGGFL bezeichnet) wurde über ihr Carboxy-Ende an die exponierten Aminogruppen auf der Oberfläche des Objektträgers gebunden. Das Peptid wurde einer DMF-Lösung mit den Kupplungsreagenzien BOP/HOBT/DIEA zugesetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur erneut durch die Durchflußzelle zirkuliert.

Ein erster Antikörper, der als Herz-Antikörper bezeichnet wird, wurde an die Oberfläche des Objektträgers angefügt, wobei er 45 Minuten in einen Supercocktail (der 1 % BSA und in diesem Fall auch 1 % Ovalbumin enthielt) mit 2 $\mu\text{g/ml}$ Antikörper getaucht wurde. Ein zweiter Antikörper, Ziegen-anti-Maus-Fluoresceinkonjugat, wurde anschließend zu 2 $\mu\text{g/ml}$ dem Supercocktailpuffer zugesetzt und 2 Stunden inkubiert.

Die Ergebnisse dieses Experiments wurden als Intensität der Fluoreszenz als eine Funktion der Lage gezeichnet. Dieses Bild wurde in 10 μm Schritten aufgenommen und zeigte, daß die Entfernung der Schutzgruppen nicht nur in einem gut definierten Muster durchgeführt werden kann, sondern auch, daß (1) das Verfahren ein erfolgreiches Kuppeln von Peptiden an die Oberfläche des Substrats bereitstellt, (2) die Oberfläche eines gebundenen Peptids zur Bindung mit einem Antikörper verfügbar war und (3) die Kapazität der Nachweisvorrichtung ausreichte, um die Bindung eines Rezeptors nachzuweisen.

I. Monomer-Monomer-Bildung von YGGFL und anschließende Exponierung gegen markierte Antikörper

Monomer-Monomer-Synthese von YGGFL und GGFL in unterschiedlichen Vierecken wurde auf einem Objektträger in einem Damebrettmuster durchgeführt und der erhaltene Objektträger gegen den Herz-Antikörper exponiert. Dieses Experiment ist in den Figuren 13A und 13B dargestellt.

In Fig. 13A ist ein Objektträger dargestellt, der mit der in diesem Fall mit t-BOC (t-Butoxycarbonyl) geschützten Aminopropylgruppe derivatisiert ist. Der Objektträger wurde mit TFA behandelt, um die t-BOC-Schutzgruppe zu entfernen. Die ϵ -Aminocaprinsäure, deren Aminogruppe mit t-BOC geschützt war, wurde anschließend an die Aminopropylgruppen gekuppelt. Die Aminocaprinsäure dient als Spacer zwischen der Aminopropylgruppe und dem zu synthetisierenden Peptid. Die Schutzgruppe am Amino-Ende des Spacers wurde entfernt und das Amino-Ende mit NVOC-Leucin gekuppelt. Der gesamte Objektträger wurde anschließend mit 12 mW 325 nm breitbandiges Licht bestrahlt. Der Objektträger wurde anschließend mit NVOC-Phenylalanin gekuppelt und gewaschen. Der gesamte Objektträger wurde erneut bestrahlt, anschließend mit NVOC-Glycin gekuppelt und gewaschen. Der Objektträger wurde erneut bestrahlt und mit NVOC-Glycin gekuppelt, um die im letzten Teil von Fig. 13A dargestellte Sequenz zu erhalten.

Wie in Fig. 13B dargestellt, wurden anschließend unter Verwendung eines Projektionsdrucks unter Verwendung einer 500 x 500 μ m Damebrettmaske unterschiedliche Bereiche des Objektträgers bestrahlt. Daher wurde die Aminogruppe von Glycin nur in den beleuchteten Bereichen exponiert. Bei der Durchführung des nächsten chemischen Kupplungsschritts wurde NVOC-Tyrosin zugesetzt, und es kuppelte nur an den Stellen, die bestrahlt worden waren. Der gesamte Objektträger wurde anschließend bestrahlt, um sämtliche NVOC-Gruppen zu entfernen, wobei ein Damebrett von YGGFL in den bestrahlten Bereichen und GGFL in den übrigen Bereichen erhalten wurde. Der Herz-Antikörper (der das YGGFL, jedoch nicht das GGFL erkennt) wurde anschließend zugesetzt und dann ein Ziegen-anti-Maus-Fluoresceinkonjugat.

Der erhaltene Fluoreszenz-Scan zeigte dunkle Bereiche, die das Tetrapeptid GGFL enthielten, das durch den Herz-Antikörper nicht erkannt wird (und daher bindet der Ziegen-anti-Maus-Antikörper mit dem Fluoresceinkonjugat nicht), und rote Bereiche, in denen YGGFL vorhanden war. Das

YGGFL-Pentapeptid wird durch den Herz-Antikörper erkannt, und daher gibt es Antikörper in den bestrahlten Bereichen, die vom Fluorescein-konjugierten Ziegen-anti-Maus-Antikörper erkannt werden können.

Ähnliche Muster für eine 50 μm Maske, die in direktem Kontakt ("Proximitätsdruck") mit dem Substrat verwendet wurde, lieferte ein Muster, das deutlicher war, und die Ecken des Damebrettmusters berührten sich, da die Maske in direktem Kontakt mit dem Substrat gebracht wurde (was zeigt, das durch Verwendung dieses Verfahrens eine erhöhte Auflösung erreicht werden kann).

J. Monomer-Monomer-Synthese von YGGFL und PGGFL

Eine Synthese wurde unter Verwendung einer 50 μm Damebrettmaske, die der in Fig. 13 dargestellten entsprach, durchgeführt. Es wurde jedoch den GGFL-Stellen auf dem Substrat durch einen weiteren Kupplungsschritt P angefügt. P wurde angefügt, indem das geschützte GGFL durch eine Maske bestrahlt und anschließend in der gleichen vorstehend beschriebenen Weise gegen P exponiert wurde. Daher enthielt die Hälfte der Bereiche auf dem Substrat YGGFL und die verbleibende Hälfte PGGFL.

Das Fluoreszenz-Diagramm für dieses Experiment zeigte, daß die Bereiche, in denen eine Bindung erfolgte oder nicht erfolgte, erneut deutlich unterscheidbar sind. Dieses Experiment zeigte, daß Antikörper eine spezifische Sequenz erkennen können und die Erkennung nicht von der Länge abhängig ist.

K. Monomer-Monomer-Synthese von YGGFL und YPGGFL

Um ein weiteres Mal zu zeigen, daß die Erfindung durchführbar ist, wurde unter Verwendung von Verfahren, die den vorstehend beschriebenen entsprachen, ein 50 μm Damebrettmuster mit alternierenden YGGFL und YPGGFL auf einem Substrat synthetisiert. Das erhaltene Fluoreszenz-

Diagramm zeigte, daß der Antikörper die YGGFL-Sequenz eindeutig erkennen konnte und die YPGGFL-Bereiche nicht signifikant band.

L. Synthese einer Anordnung von sechzehn unterschiedlichen Aminosäuresequenzen und Bestimmung der relativen Bindungsaffinität gegen Herz-Antikörper

Unter Verwendung von Verfahren, die den vorstehend beschriebenen entsprachen, wurde eine Anordnung von 16 unterschiedlichen Aminosäuresequenzen (viermal repliziert) auf beiden Glassubstraten synthetisiert. Die Sequenzen wurden synthetisiert, indem die Sequenz NVOC-GFL an die gesamte Oberfläche der Objektträger gebunden wurde. Unter Verwendung einer Reihe von Masken wurden anschließend zwei Schichten von Aminosäuren selektiv auf das Substrat aufgebracht. Jeder Bereich wies eine Abmessung von 0,25 cm x 0,0625 cm auf. Der erste Objektträger enthielt Aminosäuresequenzen, die nur L-Aminosäuren enthielten, während der zweite Objektträger die gewählten D-Aminosäuren enthielt. Die Figuren 14A und 14B zeigen eine Karte der unterschiedlichen Bereiche auf dem ersten bzw. zweiten Objektträger. Die in den Figuren 14A und 14B gezeigten Muster wurden viermal auf jedem Objektträger dupliziert. Die Objektträger wurden anschließend gegen die Herz-Antikörper und Fluoreszenz-markierten Ziegen-anti-Maus-Antikörper exponiert.

Ein Fluoreszenz-Diagramm des ersten Objektträgers, der nur L-Aminosäuren enthielt, zeigte rote Bereiche (wodurch eine starke Bindung angezeigt wird, d. h., 149 000 Zählereignisse oder mehr) und schwarze Bereiche (wodurch eine geringe oder keine Bindung des Herz-Antikörpers angezeigt wird, d. h., 20 000 Zerfälle oder weniger). Die Sequenz YGGFL wurde deutlich am stärksten erkannt. Die Sequenzen YAGFL und YSGFL zeigten ebenfalls eine starke Erkennung durch den Antikörper. Im Gegensatz dazu zeigte der größte Teil der übrigen Sequenzen eine schwache oder keine Bindung. Die vier duplizierten Teile des Objektträgers waren

extrem konsistent in der Zahl der dort gezeigten Bindungen.

Ein Fluoreszenz-Diagramm des D-Aminosäure-Objektträgers zeigte, daß die YGGFL-Sequenz die stärkste Bindung aufwies. Eine signifikante Bindung wurde ebenfalls für YaGFL, YsGFL und YpGFL nachgewiesen. Die erhaltenen Sequenzen zeigten eine schwächere Bindung an den Antikörper. Eine geringe Bindungseffizienz der Sequenz YGGFL wurde beobachtet.

Tabelle 6 zeigt eine Auflistung der verschiedenen Sequenzen, die in der Reihenfolge der relativen Fluoreszenz getestet wurden, wobei Informationen über die relative Bindungsaffinität erhalten wurden.

Tabelle 6

Beobachtete Bindung an Herz-Antikörper

<u>L-As.-Satz</u>	<u>D-As.-Satz</u>
YGGFL	YGGFL
YAGFL	YaGFL
YSGFL	YsGFL
LGGFL	YpGFL
FGGFL	fGGFL
YPGFL	yGGFL
LAGFL	faGFL
FAGFL	wGGFL
WGGFL	yaGFL
	fpGFL
	waGFL

VIII. Schlußfolgerung

Die vorliegende Erfindung stellt stark verbesserte Verfahren und eine Vorrichtung zur Synthese von Polymeren auf Substraten bereit. Es ist selbstverständlich, daß die vorstehende Beschreibung erläuternd und nicht beschränkend

sein soll. Viele Ausführungsformen werden für den Fachmann nach der Lektüre der vorstehenden Beschreibung leicht erkennbar sein. Die Erfindung ist als Beispiel beschrieben worden, primär im Hinblick auf die Verwendung von durch Licht entfernbaren Schutzgruppen, es wird jedoch dem Fachmann bewußt sein, daß auch andere Strahlungsquellen als Licht verwendet werden können. In einigen Ausführungsformen kann es beispielsweise wünschenswert sein, Schutzgruppen zu verwenden, die für eine Bestrahlung mit Elektronenstrahlen, Röntgenstrahlen zusammen mit Elektronenstrahl-Lithographie- oder Röntgen-Lithographie-Verfahren empfindlich sind. In einer anderen Ausführungsform könnte die Gruppe durch Exponierung gegen den elektrischen Strom entfernt werden.

EP-B-0 476 014
(90 90 9187.8)
Affymax Technologies
u.Z.: EP-2898

P a t e n t a n s p r ü c h e

- 5
1. Verfahren zur Herstellung eines Satzes von Polymeren durch Monomer-Monomer-Synthese auf vorbestimmten Bereichen eines Substrats, umfassend die folgenden Schritte:

10 Bestrahlung eines ersten vorbestimmten Bereichs auf einer Oberfläche des Substrats, wobei die Oberfläche funktionelle Gruppen aufweist, die mit durch Bestrahlung entfernbaren Schutzgruppen geschützt sind, um die Schutzgruppen davon zu entfernen,

15 Inkontaktbringen der Oberfläche mit einem ersten Monomer, um das Monomer an die von Schutzgruppen befreiten funktionellen Gruppen in den ersten vorbestimmten Bereichen zu kuppeln, wobei das Monomer eine funktionelle Gruppe aufweist, die mit einer durch Bestrahlung entfernbaren Schutzgruppe geschützt ist,

20 Bestrahlung eines zweiten vorbestimmten Bereiches (der der gleiche wie der erste vorbestimmte Bereich sein kann oder nicht) der Oberfläche zur Entfernung der Schutzgruppen davon,

25 Inkontaktbringen der Oberfläche mit einem zweiten Monomer (das das gleiche wie das erste Monomer sein kann oder nicht), um das Monomer an die von den Schutzgruppen befreiten funktionellen Gruppen in dem zweiten vorbestimmten Bereich zu kuppeln, wobei das Monomer eine funktionelle Gruppe aufweist, die mit einer durch Bestrahlung entfernbaren Schutzgruppe geschützt ist,

30 wobei das Verfahren ferner die Durchführung zusätzlicher Schritte der Bestrahlung und des Inkontaktbringens mit Monomer und zusätzlicher Kupplungsschritte umfaßt, die

35

1 zur Bildung des Satzes notwendig sind, wobei mindestens
ein Teil von mindestens einem der ersten und zweiten
vorbestimmten Bereiche in mindestens einem dieser zu-
sätzlichen Schritte bestrahlt wird und wobei die Poly-
5 mere Stellen auf der Oberfläche und Sequenzen aufweisen,
die durch die Bestrahlungsmuster definiert sind, die
während der Bestrahlungsschritte verursacht werden, und
durch die besonderen Monomere, die in den Kontakt- und
Kupplungsschritten gekuppelt werden, und mit der Maß-
10 gabe, daß das letzte Monomer in jeder Sequenz nicht mit
einer durch Bestrahlung entfernbaren Schutzgruppe ge-
schützt sein muß.

15 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Satz mehr als etwa
100 verschiedene Polymere umfaßt.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei der Satz mindestens 10^3
verschiedene Polymere umfaßt.

20 4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei der Satz 10^4 , 10^5 oder
 10^6 verschiedene Polymere umfaßt.

25 5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei
verschiedene Polymere an verschiedenen Stellen von weni-
ger als etwa $0,1 \text{ cm}^2$ Größe vorliegen.

30 6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei verschiedene Polymere
an verschiedenen Stellen mit Größen zwischen etwa $1 \mu\text{m}^2$
und $10\,000 \mu\text{m}^2$ vorliegen.

35 7. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die zusätzlichen
Schritte so durchgeführt werden, daß mindestens 1000
verschiedene Polypeptide auf der Oberfläche syntheti-
siert werden und verschiedene Polypeptide an verschie-
denen Stellen mit Größen von weniger als etwa 1×10^{-3}
 cm^2 vorliegen.

- 1 8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei
die Monomeren ausgewählt sind aus L-Aminosäuren, D-Ami-
nosäuren und synthetischen Aminosäuren.
- 5 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die
Monomere Nucleotide sind.
- 10 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, als weiteren
Schritt umfassend das Inkontaktbringen der Oberfläche
mit einem Rezeptor und das Identifizieren der Polymere,
die an den Rezeptor binden.
- 15 11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei der Rezeptor ein Anti-
körper ist.
- 20 12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, wobei der Rezeptor
außerdem einen radioaktiven, einen fluoreszierenden oder
einen anderen Marker umfaßt und wobei der Identifizie-
rungsschritt den Nachweis der Stelle des Markers auf dem
Substrat umfaßt.
- 25 13. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, wobei der Identifi-
zierungsschritt außerdem den Schritt des Inkontaktbrin-
gens des Rezeptors mit einem zweiten Rezeptor umfaßt,
der einen Marker aufweist und der spezifisch an den Re-
zeptor bindet, der an die Monomersequenzen gebunden ist.
- 30 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei das
Substrat ausgewählt ist aus polymerisiertem Langmuir-
Blodgett-Film, funktionalisiertem Glas, Si, Ge, GaAs,
GaP, SiO₂, SiN₄, modifiziertem Silikon,
(Poly)tetrafluorethylen, Polystyrol,
(Poly)vinylidendifluorid und Kombinationen davon.
- 35 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die
Schutzgruppen nitroaromatische Verbindungen sind.

- 1 16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Schutzgruppen
ortho-Nitrobenzyl-derivate sind.
- 5 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die
Schutzgruppen ausgewählt sind aus 6-Nitroveratryloxycar-
bonyl-, 2-Nitrobenzyloxycarbonyl-, Dimethyldimethoxyben-
zyloxycarbonyl-, 5-Brom-7-nitroindoliny-, o-Hydroxy - α -
methylcinnamoyl- oder 2-Oxymethylenanthrachinongruppen
und Gemischen davon.
- 10 18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die Schutzgruppen 6-
Nitroveratryloxycarbonylgruppen sind.
- 15 19. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die Schutzgruppen 2-
Nitrobenzyloxycarbonylgruppen sind.
- 20 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, wobei die
Bestrahlungsschritte unter Verwendung von UV-Licht,
sichtbarem Licht oder Infrarotlicht oder einer Kombina-
tion davon durchgeführt werden.
- 25 21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, wobei die
Bestrahlungsschritte außerdem die folgenden Schritte um-
fassen:
- 30 i) Maskierung des Substrats mit einer lithographischen
Maske, die im wesentlichen transparente Bereiche und
im wesentlichen nichttransparente Bereiche bei einer
bestimmten Wellenlänge des Lichts aufweist,
ii) Bestrahlen der Maske mit einer Lichtquelle, die min-
destens diese Wellenlänge des Lichts liefert.
- 35 22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21, wobei im
ersten Bestrahlungsschritt sich die funktionellen Grup-
pen auf Linkermolekülen befinden, die an das Substrat
geknüpft sind.

1 23. Verwendung einer Vorrichtung, wobei die Vorrichtung für
die Durchführung eines Verfahrens gemäß Anspruch 1 ge-
eignet ist und umfaßt:

5 (a) ein Substrat mit einer Oberfläche, die funktionelle
Gruppen aufweist, die durch Schutzgruppen geschützt
sind, welche durch Bestrahlung entfernbare sind, wo-
bei die Oberfläche an der Stelle, wo die Schutzgrup-
pen entfernt wurden, aktiviert ist,

10 (b) Mittel zur selektiven Bestrahlung vorbestimmter Be-
reiche auf der Oberfläche, und

15 (c) eine Strahlungsquelle zur Bestrahlung der Oberflä-
che, wobei die Vorrichtung zur Bestrahlung der vor-
bestimmten Bereiche in einer vorbestimmten Reihen-
folge und für jede der vorbestimmten Bereiche eine
vorbestimmte Anzahl von Wiederholungen verwendet
wird, so daß eine Vielzahl von Polymeren hergestellt
wird, die aus mindestens zwei Monomeren bestehen und
Stellen auf der Oberfläche aufweisen, die durch die
Bestrahlungsmuster definiert sind, die während der
20 Bestrahlung verursacht werden.

24. Verwendung nach Anspruch 23, wobei mehr als 100 Polymer-
bereiche produziert werden.

25 25. Verwendung nach Anspruch 24, wobei mindestens 10^2 und
gegebenenfalls 10^4 , 10^5 oder 10^6 Polymerstellen produ-
ziert werden.

30 26. Verwendung nach einem der Ansprüche 23 bis 25, wobei
jede Stelle eine Größe von weniger als $0,1 \text{ cm}^2$ auf-
weist.

35 27. Verwendung nach Anspruch 26, wobei jede Stelle eine
Größe zwischen $1 \mu\text{m}^2$ und $10\,000 \mu\text{m}^2$ aufweist.

1 28. Verwendung nach einem der Ansprüche 23 bis 27, wobei
das Substrat gemäß Anspruch 14 definiert ist und/oder
die Schutzgruppen gemäß einem der Ansprüche 15 bis 19
definiert sind.
5

10

15

20

25

30

35

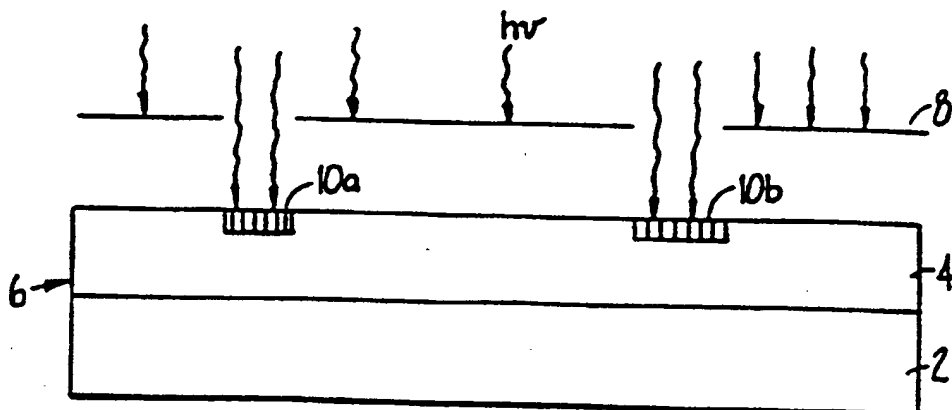


FIG. 1.

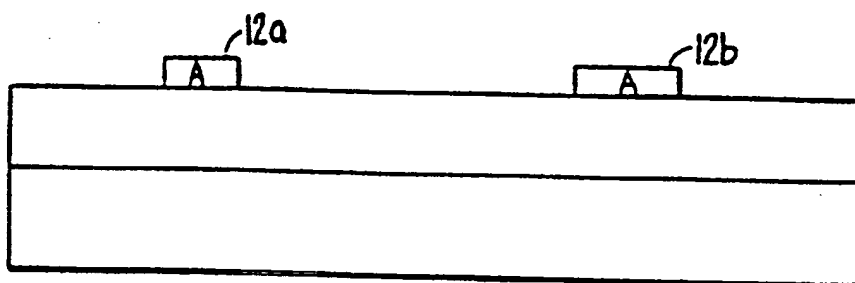


FIG. 2.

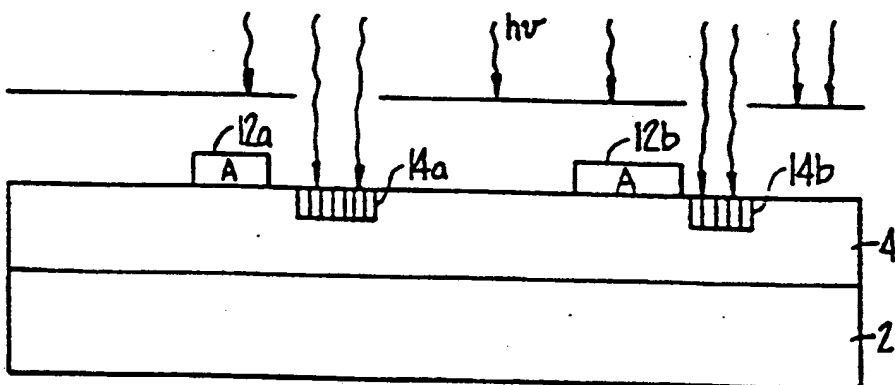


FIG. 3.

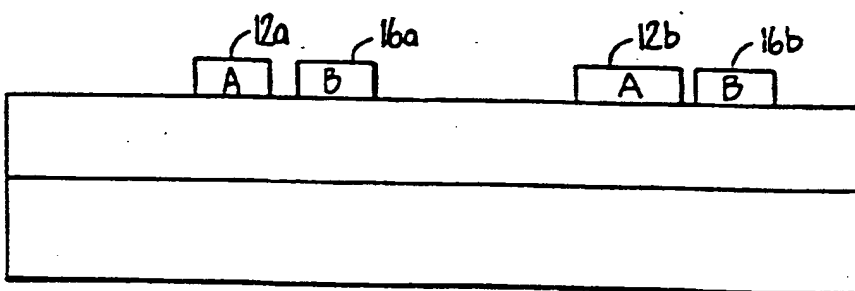


FIG. 4.

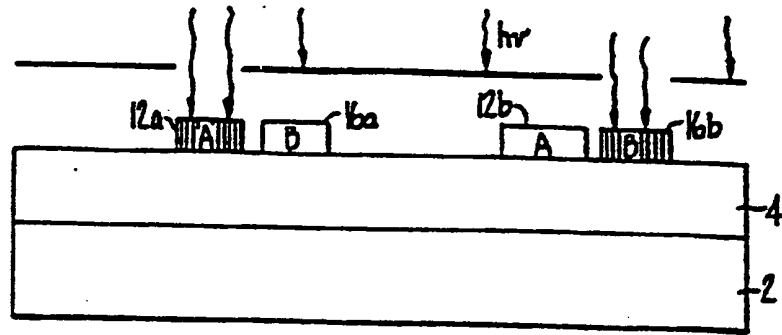


FIG. 5.

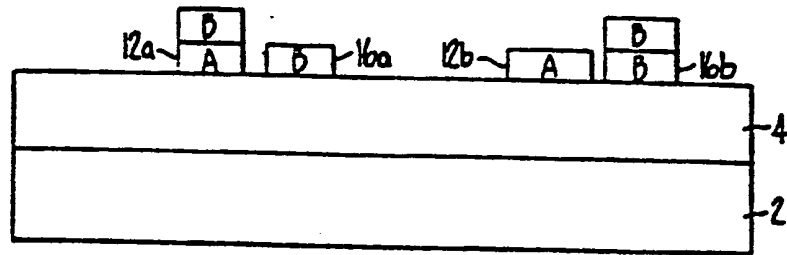


FIG. 6.

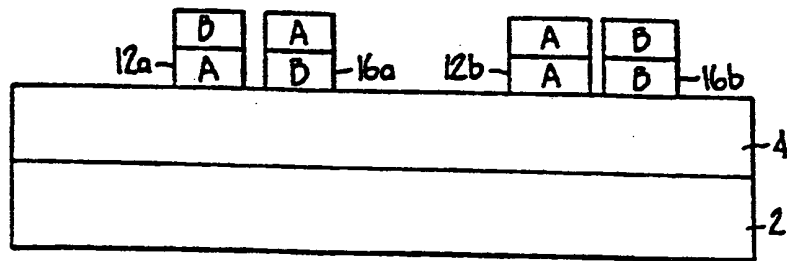


FIG. 7.

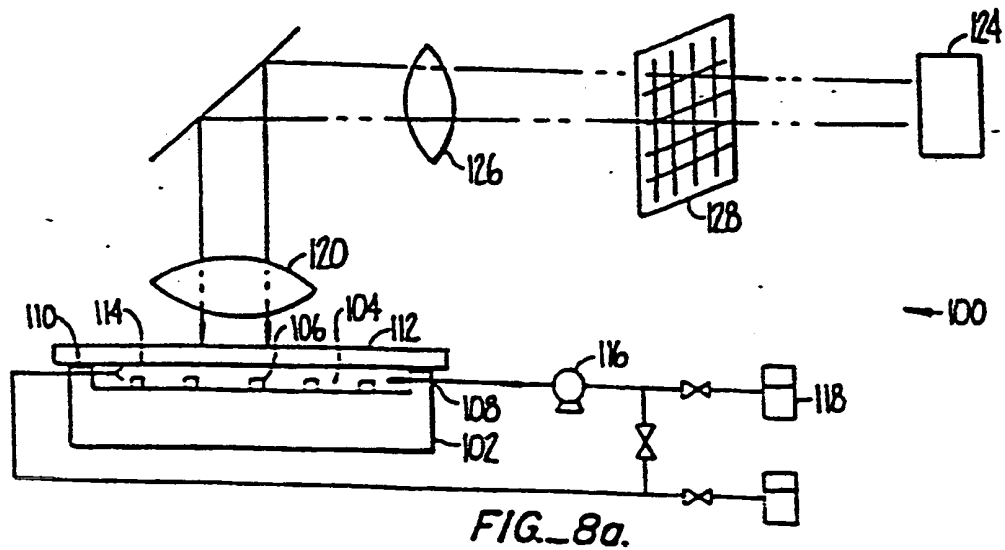


FIG. 8a.

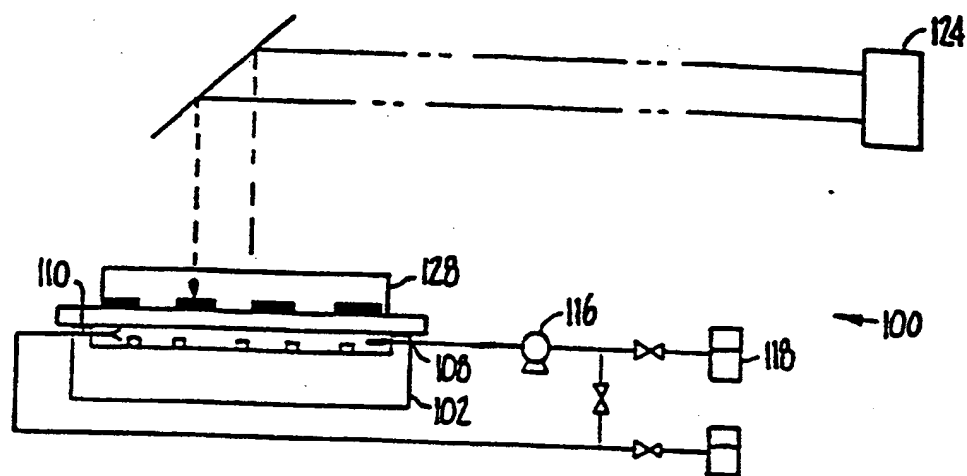


FIG. 8b

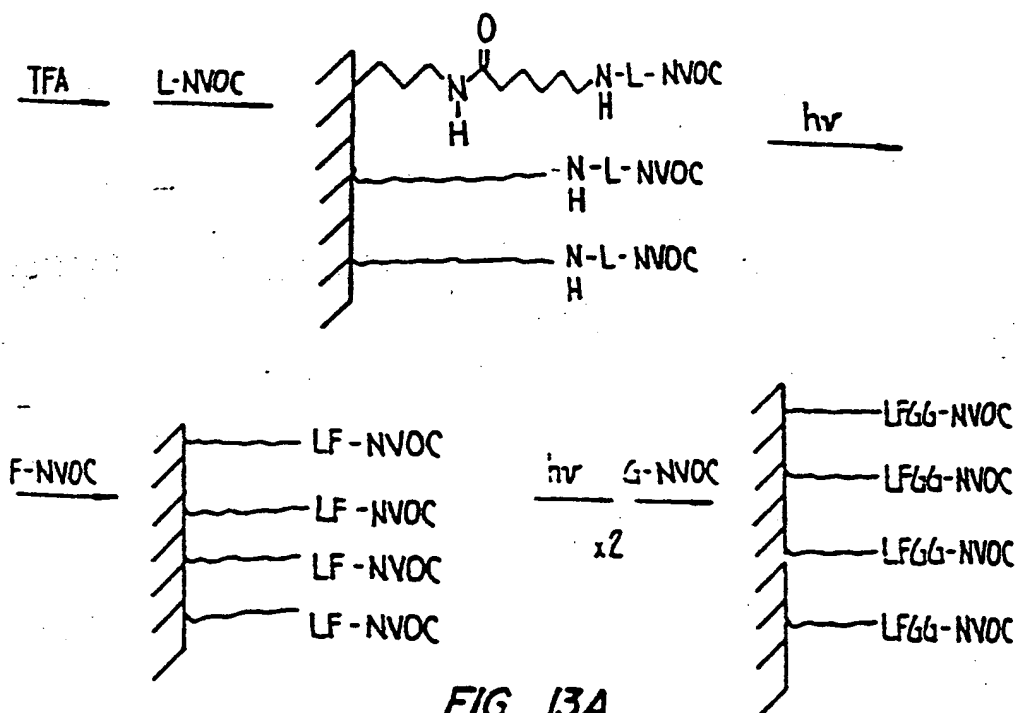
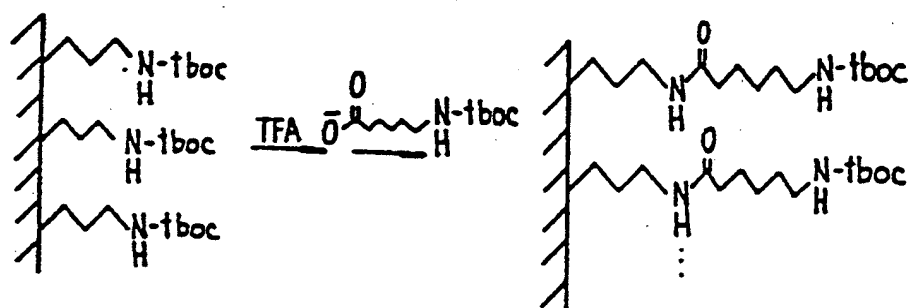


FIG. 13A.

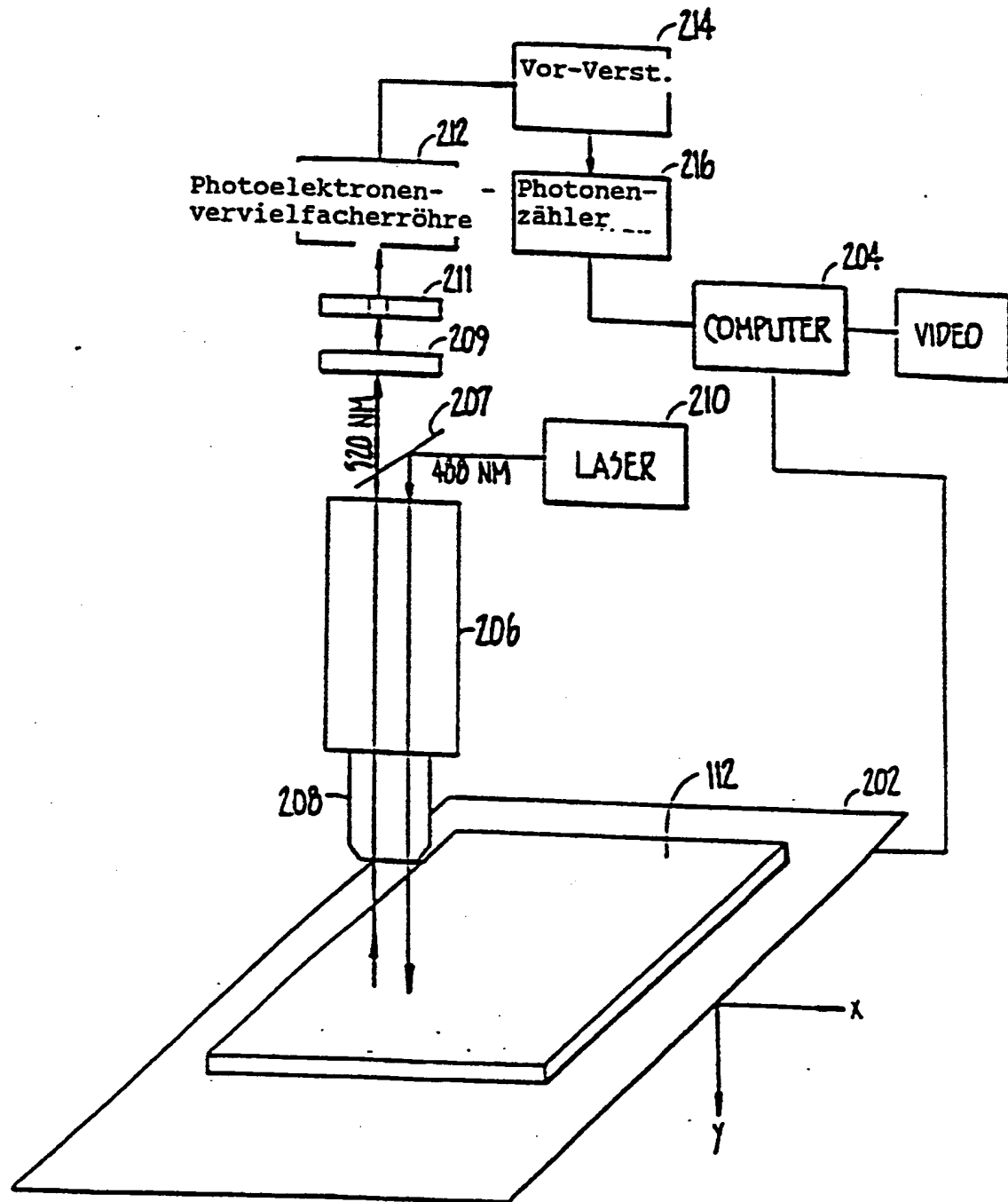


FIG. 9.

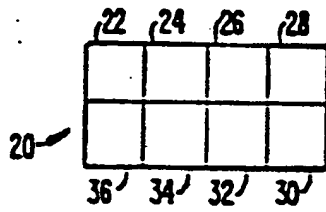


FIG. 10A.

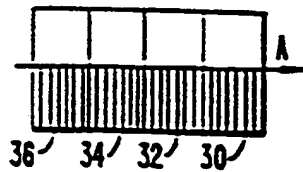


FIG. 10B.

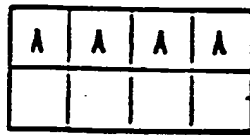


FIG. 10C.

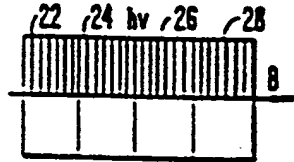


FIG. 10D.

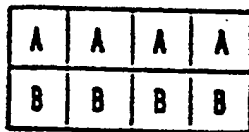


FIG. 10E.

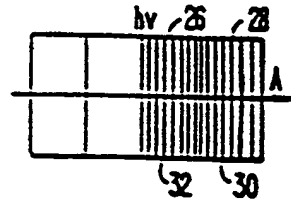


FIG. 10F.

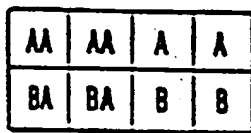


FIG. 10G.

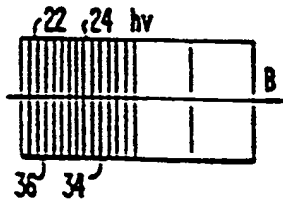


FIG. 10H.

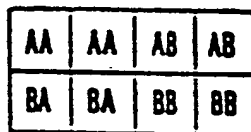


FIG. 10I.

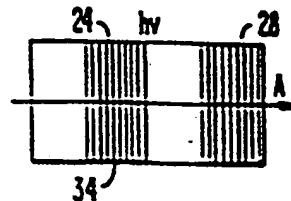


FIG. 10J.

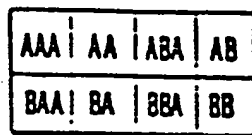


FIG. 10K.

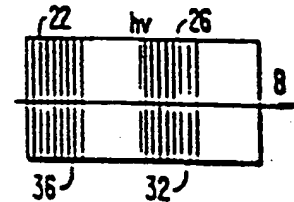


FIG. 10L.

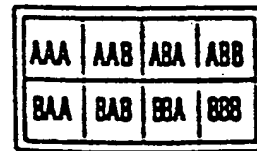
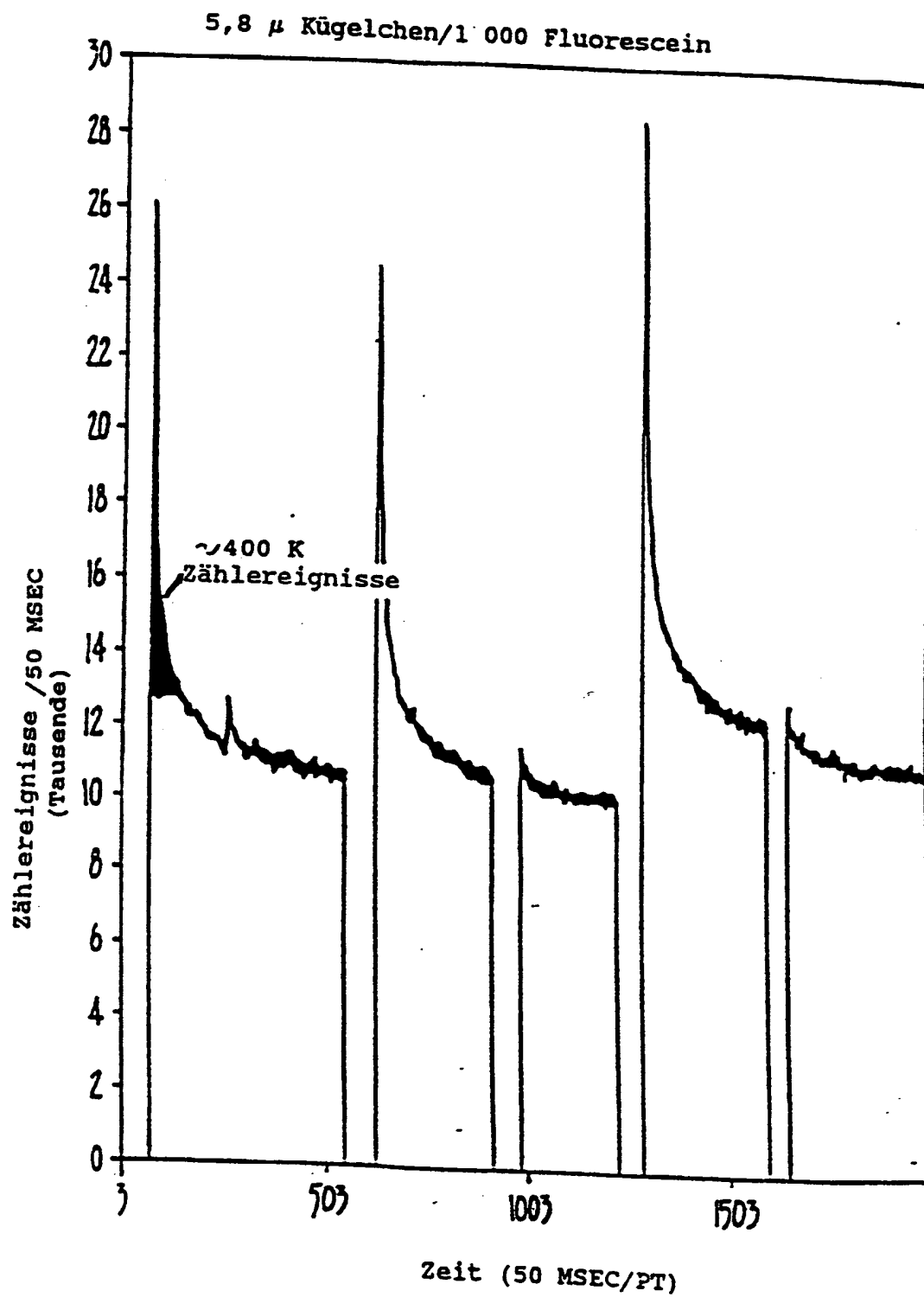


FIG. 10M.



$\sim 2 \times 10^{-6}$ CHROMOPHOR / \AA^2

FIG. 11A.

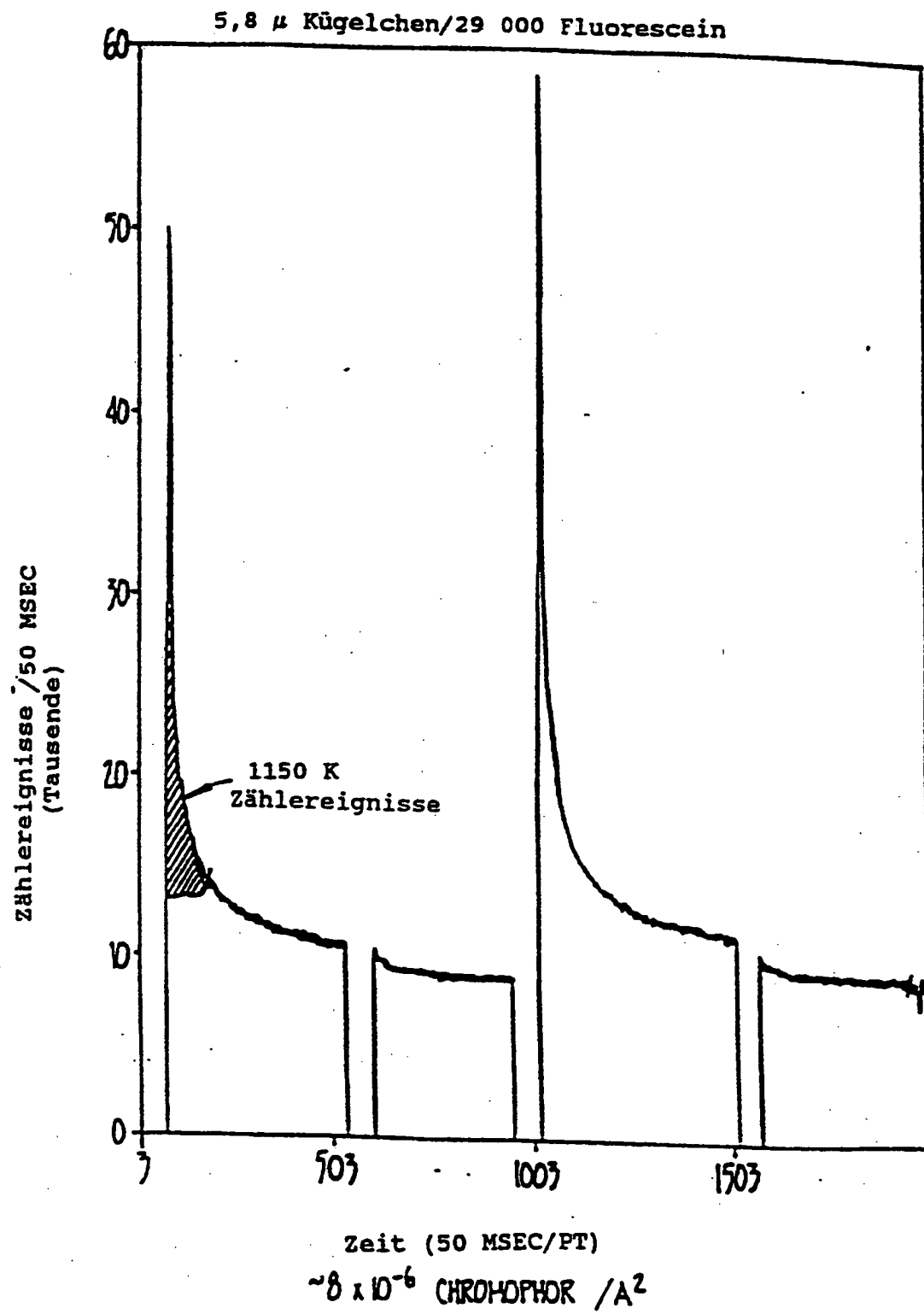


FIG. IIB.

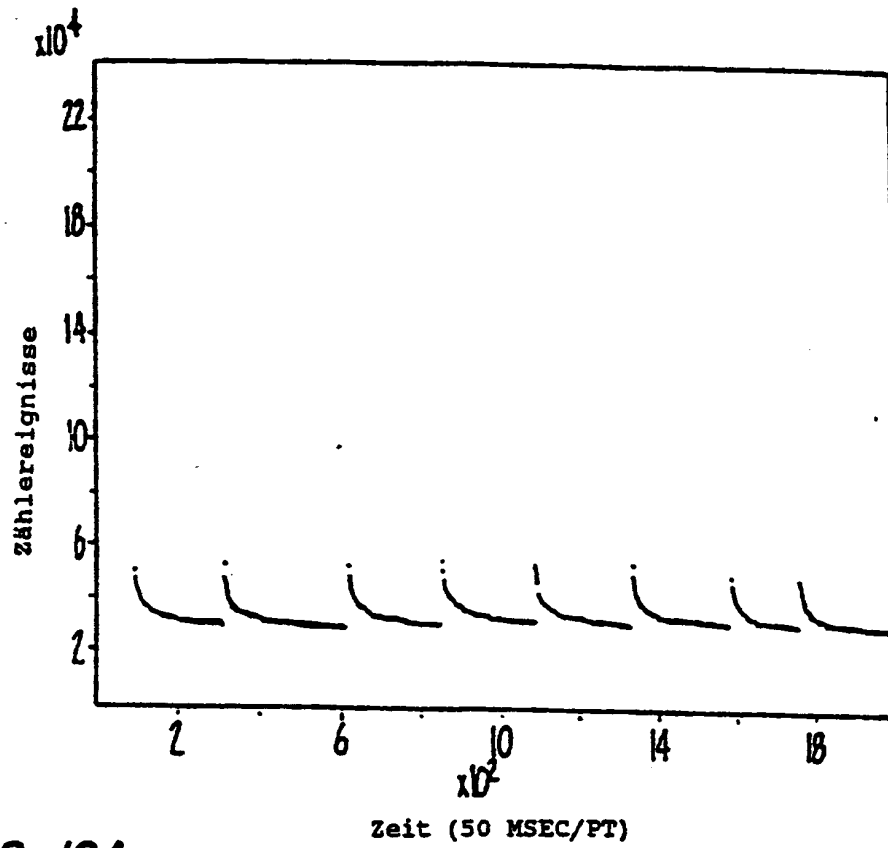


FIG 12A.

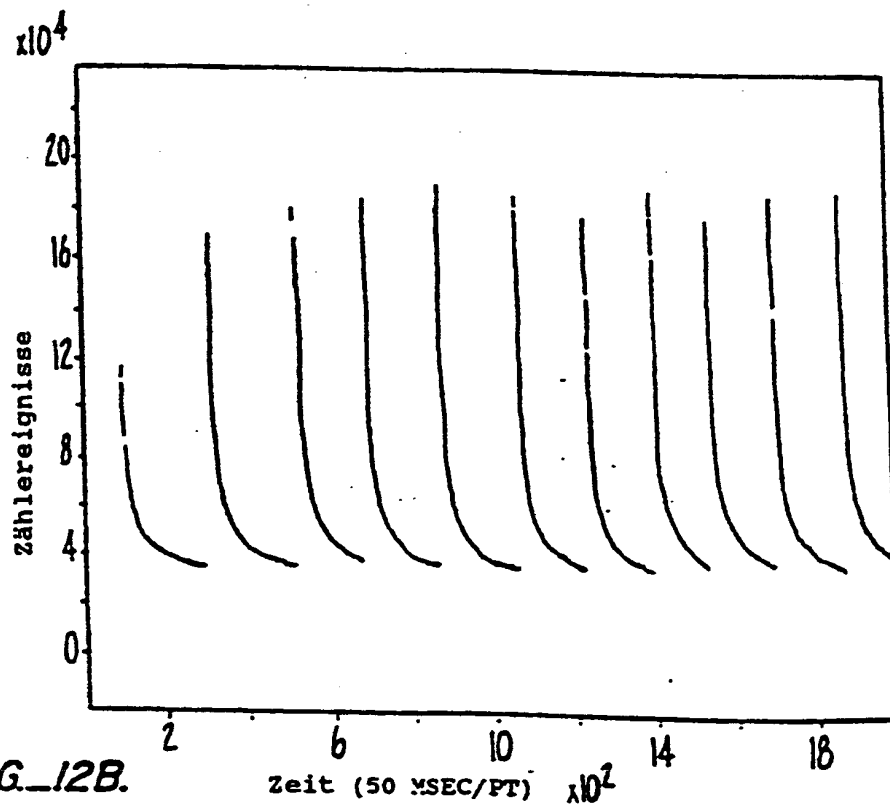


FIG 12B.

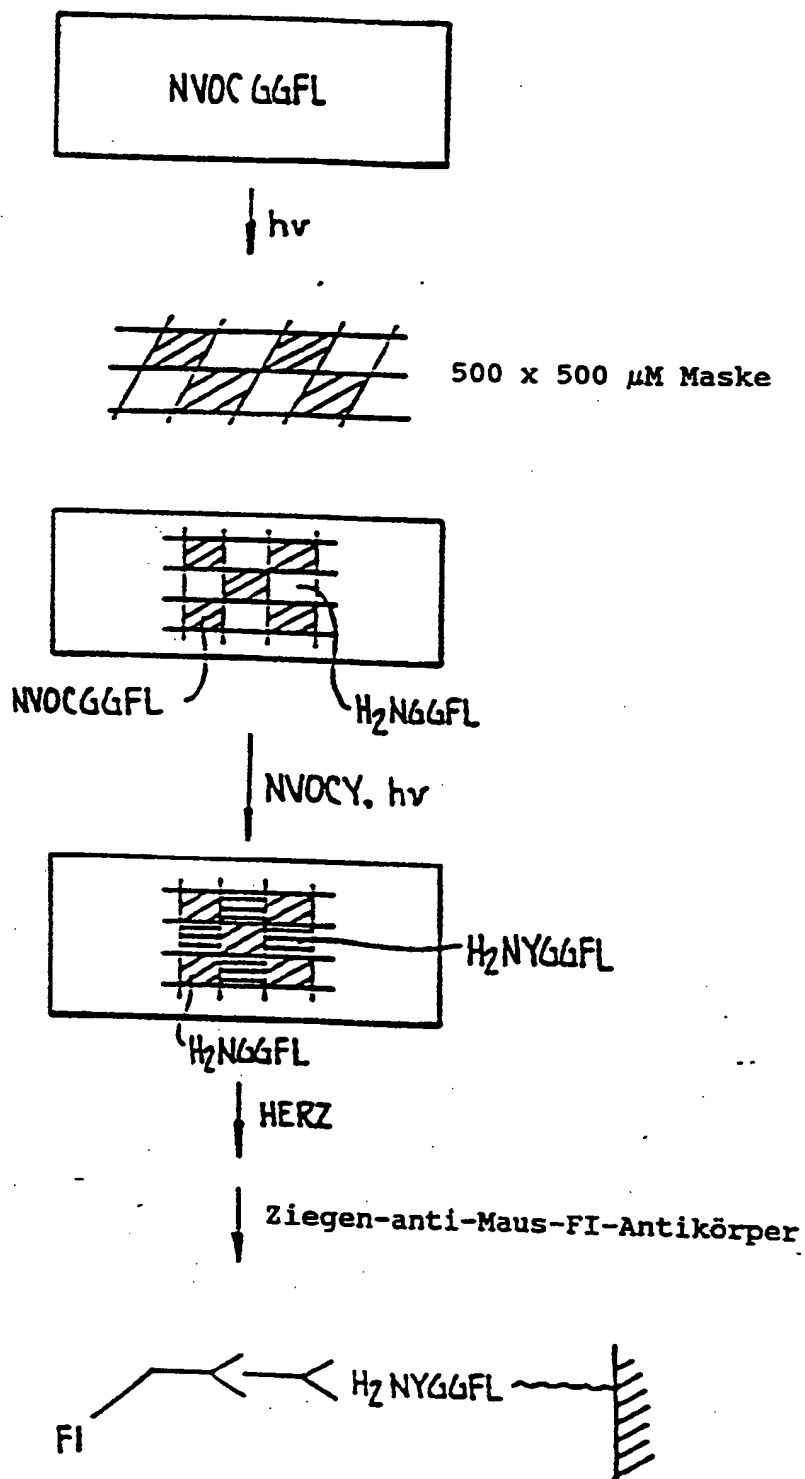


FIG. 13B

P	A	S	G	
<u>LP</u> 6FL	<u>LA</u> 6FL	<u>LS</u> 6FL	<u>LG</u> 6FL	L
<u>FP</u> 6FL	<u>FA</u> 6FL	<u>FS</u> 6FL	<u>FG</u> 6FL	F
<u>WP</u> 6FL	<u>WA</u> 6FL	<u>WS</u> 6FL	<u>WG</u> 6FL	W
<u>YP</u> 6FL	<u>YA</u> 6FL	<u>YS</u> 6FL	<u>YG</u> 6FL	Y

L-Satz

FIG. 14A.

P	a	s	G	
<u>Yp</u> 6FL	<u>Ya</u> 6FL	<u>Ys</u> 6FL	<u>YG</u> 6FL	Y
<u>fp</u> 6FL	<u>fa</u> 6FL	<u>fs</u> 6FL	<u>fg</u> 6FL	f
<u>wp</u> 6FL	<u>wa</u> 6FL	<u>ws</u> 6FL	<u>wg</u> 6FL	w
<u>yp</u> 6FL	<u>ya</u> 6FL	<u>ys</u> 6FL	<u>yg</u> 6FL	y

D-Satz

FIG. 14B.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)